

TRANSFORMATION
DER TRICHOTHECENE T-2 TOXIN
UND DIACETOXYSCIRPENOL
DURCH MIKROORGANISMEN

Christine Zeilinger

Diss
München
1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

Arbeit angefertigt unter Leitung von Frau Prof. Dr. B. Gedeke

TRANSFORMATION DER TRICHOTHECENE
T-2 TOXIN UND DIACETOXYSCIRPENOL
DURCH MIKROORGANISMEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Ursula Christine Zeilinger
aus
Leutershausen
München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker
Referent: Prof. Dr. B. Gedek
Korreferent: Priv. Doz. Dr. Dr. habil. J. Wittmann

Tag der Promotion: 28. Februar 1986

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
2. Schrifttum	2
2.1. Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen und Cumarinderivaten	2
2.1.1. Aflatoxine	2
2.1.2. Ochratoxin A	11
2.2. Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen und Trichothecenen	15
2.2.1. 12,13-Epoxytrichothec-9-ene der Gruppe A	16
2.2.2. 12,13-Epoxytrichothec-9-ene der Gruppe B und C	27
2.2.3. 12,13-Epoxytrichothec-9-ene der Gruppe D	32
2.3. Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen und sonstigen Mykotoxinen	36
2.3.1. Zearalenon	36
2.3.2. Patulin	38
2.3.3. Rubratoxine	41
2.3.4. Gliotoxin	43
3. Eigene Untersuchungen	45
3.1. Material und Herkunft	45
3.1.1. Mikroorganismen	45
3.1.2. Substrate	47
3.1.3. Toxine	48

	Seite
3.2. Methoden	48
3.2.1. Prüfung von Bakterien, Algen, Hefen und Schimmelpilzen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol	48
3.2.1.1. Herstellung der Keimsuspensionen und Be- impfung der Testplatten	48
3.2.1.2. Beschickung der Testplatten mit Toxinen	49
3.2.1.3. Wachstumsbedingungen und Beurteilung	50
3.2.2. Untersuchungen zur Transformation von T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol	51
3.2.2.1. In Kulturmedien	51
3.2.2.1.1. Versuchsanordnung und -durchführung	51
3.2.2.1.2. Mykotoxinanalyse	53
3.2.2.1.2.1. Extraktion	53
3.2.2.1.2.2. Physikalisch-chemische Nachweisverfahren	53
3.2.2.2. In Futtermitteln	56
3.2.2.2.1. Versuchsanordnung und -durchführung	56
3.2.2.2.1.1. Mischfutter	56
3.2.2.2.1.2. Grünmais	58
3.2.2.2.2. Mikrobiologische und chemische Untersuchungen	59
3.2.2.2.3. Mykotoxikologische Untersuchungen	61
3.2.2.2.3.1. Extraktion und Reinigung des Probenmaterials	61
3.2.2.2.3.2. Physikalisch-chemische Nachweisverfahren	62
3.2.2.2.3.3. Biologischer Test	63

	Seite
3.3. Ergebnisse und deren Besprechung	64
3.3.1. Beeinflussung des Wachstums von Mikroorganismen durch T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol	64
3.3.2. Transformation von T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol	69
3.3.2.1. In Standard-I-Bouillon mit Bakterien	69
3.3.2.2. In keimfreier Standard-I-Bouillon	82
3.3.2.3. Im Medium nach Ueno et al. (1983)	85
3.3.2.4. In Mischfutter	86
3.3.2.5. In Grünmaissilage	100
4. Diskussion	104
5. Zusammenfassung	110
Summary	113
6. Literaturverzeichnis	116

Lebenslauf

1. Einleitung

Lebens- und Futtermittel enthalten zuweilen toxische Stoffwechselprodukte von Feld- und Lagerungspilzen (SHOTWELL et al., 1975; JEMMALI et al., 1978; GAREIS et al., 1985). Wegen der teilweisen hohen Toxizität dieser sekundären Metaboliten des Pilzstoffwechsels für Mensch und Tier wurden verschiedentlich bereits physikalisch-chemische Verfahren auf ihre Eignung zur gezielten Dekontamination von Lebens- und Futtermitteln untersucht (HANSON und HAGEDORN, 1969; HAFEZ und MEGALLA, 1982; CARSON und SMITH, 1983; DETZLER, 1985). Dabei wurde angestrebt, Verfahren zu finden, mit welchen nach Möglichkeit die Mehrzahl der sich chemisch voneinander unterscheidenden, hauptsächlich in der Nahrung von Mensch und Tier anzutreffenden Mykotoxine entgiftet werden kann (GOLDBLATT und DOLLEAR, 1977; DOYLE et al., 1982). Daneben verdient Beachtung, inwiefern diese Verbindungen durch vom Substrat oder von Mikroorganismen ausgehende Prozesse in weniger toxische oder gar detoxifizierte Produkte überführt werden. Da Futtermittel stets keimhaltig sind und an Tiere in der Regel erst verabreicht werden, wenn sie über eine geraume Zeit gelagert wurden, erhebt sich die Frage, ob die zuweilen bereits auf der Pflanze, also noch vor der Ernte, von Fusarien gebildeten Trichothecene gegebenenfalls durch Mikroorganismen des heterogenen Keimbesatzes von Futtermitteln verändert werden. Gemäß der hohen Toxizität der Trichothecene T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol (DAS) für alle Tierarten und ihres relativ häufigen Nachweises in heimischem Futtergetreide (GAREIS et al., 1985) war es Aufgabe vorliegender Arbeit, in Futtermitteln anzutreffende Mikroorganismen auf ihr Transformationsvermögen dieser Toxine zu untersuchen. Dabei sollten physikalisch-chemische Analysenverfahren Anwendung finden, mit denen der Nachweis einer Transformation über eventuell entstehende Zwischenprodukte bis hin zur vollständigen Veränderung des ursprünglichen Toxinmoleküls möglich ist.

2. Schrifttum

2.1. Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen und Cumarinderivaten

2.1.1. Aflatoxine

Die Aflatoxine B_1 , B_2 , G_1 und G_2 sind vor allem als hepato-toxische und kanzerogene Stoffwechselprodukte des *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* in Lebens- und Futtermitteln anzutreffen. Sie gehören einer Gruppe von Difurocumarinen mit gleicher Grundstruktur an (vgl. Abb.1), wobei Aflatoxin B_2 und G_2 Dihydroderivate von Aflatoxin B_1 und G_1 darstellen (GEDEK, 1980).

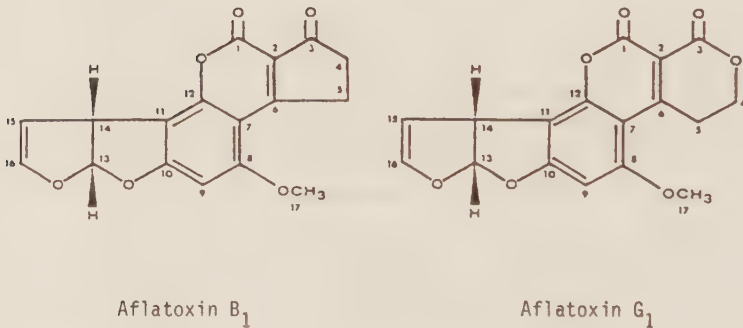


Abb.1: Chemische Struktur von Aflatoxin B_1 und Aflatoxin G_1

Einige derjenigen Mikroorganismen, die zur Transformation von Aflatoxinen befähigt sind, sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Mit Ausnahme von *Streptococcus lactis* und *Flavobacterium aurantiacum*

bauten Bakterien und Hefen Aflatoxin B_1 zu nicht näher charakterisierten, nicht mehr im langwelligen UV-Licht fluoreszierenden Verbindungen ab (ARAI et al., 1967; MANN und REHM, 1977). Lebende Zellen von *Flavobacterium aurantiacum* wandelten Aflatoxin B_1 und Aflatoxin G_1 jedoch vollständig in im Entenkükentest nicht mehr toxisch wirkende Substanzen um (CIEGLER et al., 1966). Bei der Fermentation von Aflatoxin B_1 -kontaminierter Milch mit *Streptococcus lactis* wurden Aflatoxin B_{2a} und Aflatoxicol gebildet (MEGALLA und MOHRAN, 1984). Aflatoxin B_{2a} entstand aus Aflatoxin B_1 durch Bindung von Wasser an dessen terminalen Furanring und zeichnete sich im Hühnerembryo- und Entenkükentest durch eine geringere Toxizität aus (CIEGLER und PETERSON, 1968; POHLAND et al., 1968; LILLEHOJ und CIEGLER, 1969). Aflatoxicol gilt als eines der Transformationsprodukte des Aflatoxin B_1 , hervorgehend aus diesem durch Reduktion der Ketogruppe am Cyclopanantrenring des Aflatoxin B_1 -Moleküls. Es konnte in Form von zwei Stereoisomeren nachgewiesen werden (DETROY und HESSELTINE, 1969; COLE et al., 1972). Im biologischen Test mit Entenküken erwies sich Aflatoxicol ungefähr 18mal geringer toxisch als Aflatoxin B_1 (DETROY und HESSELTINE, 1968). Die Reduktion von Aflatoxin B_1 zu Aflatoxicol erfolgte auch, wie der Tabelle 1 entnommen werden kann, durch eine Vielzahl von Schimmelpilzen (DETROY und HESSELTINE, 1969; COLE et al., 1972; MANN und REHM, 1976). Bei Versuchen von COLE und KIRKSEY (1971) war eine Transformation von Aflatoxin G_1 durch einige *Rhizopus* Arten zu beobachten. Durch Spaltung des Lactonringes mit anschließender Decarboxylierung entstand aus Aflatoxin G_1 Aflatoxin B_3 (= Parasiticol) (COLE und KIRKSEY, 1971). Aflatoxin B_3 unterschied sich im Entenkükentest in der Toxizität nicht vom Aflatoxin B_1 . Bei der Prüfung im Hühnerembryotest ergab sich dagegen eine um den Faktor 100 geringere (STUBBLEFIELD et al., 1970) Toxizität des Carboxylierungsproduktes im Vergleich zum Aflatoxin B_1 . Auch Protozoen wie der Ciliat *Tetrahymena pyriformis* zeigen Eigenschaften, die sie zur Veränderung des Aflatoxin B_1 -Moleküls be-

fähigen. Als Transformationsprodukt des genannten Ciliaten konnte eine fluoreszierende Verbindung identifiziert werden, welche vermutlich mit Aflatoxicol identisch ist. Ein Abbau von Aflatoxin G₁ durch diese Art konnte jedoch nicht beobachtet werden (TEUNISSON und ROBERTSON, 1967).

In Praxis orientierten Versuchen gelang es CIEGLER et al. (1966) und LILLEHOJ et al. (1971) natürlich mit Aflatoxinen kontaminierte Lebens- und Futtermittel wie Milch, Maisöl, Erdnußbutter, Mais und Erdnüsse mit *Flavobacterium aurantiacum* zu dekontaminieren. Jedoch erwies sich die Zahl der dazu benötigten Bakterien als Handicap für eine praktische Anwendung eines solchen Verfahrens (LILLEHOJ et al., 1971).

Auch Keime der Darm- und Faecesflora von Monogastriern waren zur Aflatoxintransformation befähigt (ITOH et al., 1978; 1979), während Pansenmikroben diese Eigenschaft in Versuchen von KIESSLING et al., (1984) nicht zeigten.

Die Befähigung zur Transformation von Aflatoxin B₁ zu Aflatoxicol durch Schimmelpilze unterschiedlicher Standorte, gibt Anlaß zu der Annahme, daß diese Umwandlung überall in der freien Natur stattfinden kann (DETROY und HESSELTINE, 1969).

Ein Abbau von Aflatoxin B₁ und Aflatoxin G₁ im Erdboden war allerdings von dessen pH-Wert, den organischen und anorganischen Bestandteilen und der mikrobiellen Begleitflora abhängig (CHANG und LYND, 1970). Der Feuchtigkeitsgehalt hatte bei Erdnußkernen einen wesentlichen Einfluß auf die Bildung und den Abbau von Aflatoxinen durch Schimmelpilze, wie Untersuchungen von ASHWORTH et al. (1965) zeigten. Auch wird anhand der Ergebnisse von in vitro-Versuchen anderer Untersucher vermutet, daß die Aflatoxinkonzentration im Medium, das Nährsubstrat selbst und sein pH-Wert, die Temperatur, die Zellzahl und

das Alter der Zellen sowie die Wachstumsphase der Kultur die Abbaurate beeinflussen (CIEGLER et al., 1966; MANN, 1975; MANN und REHM, 1977; DOYLE und MARTH, 1978 a+b).

Eine relativ große Zahl von Spezies der Gattung *Pseudomonas* waren ebenfalls in der Lage, Aflatoxin B_1 abzubauen; jedoch war letztendes dieser Effekt nicht auf die Bakterien, sondern auf das alkalische Nährmedium zurückzuführen (CIEGLER et al., 1966). Im alkalischen Milieu wurde Aflatoxin B_1 zu Aflatoxinsäure hydrolysiert (KIERMEIER und RUFFER, 1974). In 2%iger Milchsäurelösung (HAFEZ und MEGALLA, 1982) und in 0,1 N Zitronensäurelösung (CIEGLER und PETERSON, 1968) erfolgte eine Umwandlung von Aflatoxin B_1 in das Hemiacetalaflatoxin B_{2a} . Dergleichen beobachteten CIEGLER und PETERSON (1968) auch in säureproduzierenden Schimmelpilzkulturen. Doch DOYLE und MARTH (1978 b) zeigten in Versuchen mit *Aspergillus parasiticus*, daß enzymatische Aktivitäten ebenfalls am Aflatoxinabbau beteiligt sind. Das Mycel von *Aspergillus parasiticus* zerstörte Aflatoxin B_1 und Aflatoxin G_1 möglicherweise mit Hilfe pilzeigener Oxidasen. Je höher die Peroxidaseaktivität des Pilzes war, desto mehr Toxin wurde abgebaut (DOYLE und MARTH, 1979). Auch besaßen Schimmelpilzstämmen, welche große Mengen an Aflatoxinen produzierten, die Fähigkeit, die gebildeten Toxine wieder abzubauen (DOYLE und MARTH, 1978 a).

Auf eine aktive mikrobielle Stoffwechselfähigkeit war auch die Aflatoxintransformation durch Bakterien zurückzuführen, da nur lebende Zellen von *Flavobacterium aurantiacum* Aflatoxin B_1 abbauen konnten (CIEGLER et al., 1966; LILLEHOJ et al., 1967 a). Versuche mit Zellwandbruchstücken gaben zu der Vermutung Anlaß, daß Aflatoxin zwar locker, möglicherweise durch Wasserstoffbrückenbindungen oder van der Waal'sche Kräfte an die Bakterienzellwand gebunden werden kann (LILLEHOJ et al., 1967 a), für eine feste und irreversible Bindung des Toxins mit anschließendem Abbau aber sind lebende Zellen von *Flavobacterium*

aurantiacum (CIEGLER et al., 1966) erforderlich.

Nach Versuchen von BURMEISTER und HESSELTINE (1966) erwiesen sich Bakterien größtenteils, sowie alle Hefen und Schimmelpilze und der einzige geprüfte Ciliat gegenüber 30 µg Aflatoxin B₁/ml Medium als resistent. Eine antibiotische Wirkung war nur gegenüber mehreren Spezies der Gattung Bacillus (BURMEISTER und HESSELTINE, 1966; LILLEHOJ und CIEGLER, 1968; BOUTIBONNES, 1978) zu verzeichnen. Aflatoxin B₁ zeigte keine antibiotische Wirkung gegenüber den von ARAI et al. (1967) getesteten, ubiquitär vorkommenden grampositiven und gramnegativen Bakterien. LILLEHOJ und CIEGLER (1970 a) untersuchten die Wirkung von Aflatoxin B₁ auf die Biosynthese von Enzymen mit zwei Stämmen von Bacillus cereus und mit zwei Stämmen von Bacillus licheniformis und bewiesen dessen konzentrationsabhängige Wirkung auf die Penicillinasebildung durch diese Mikroorganismen. Das Wachstum von Flavobacterium aurantiacum war in Gegenwart von 15 µg Aflatoxin B₁/ml Medium vermindert. Auch konnte die Bildung abnormer Zellformen bei diesen Bakterien induziert werden (LILLEHOJ et al., 1967 a). Versuche von LILLEHOJ und CIEGLER (1967) zeigten, daß Aflatoxin B₁ die DNA-Synthese von Flavobacterium aurantiacum hemmt. Eine Beeinträchtigung der Bakterienzellwandsynthese wurde ebenfalls diskutiert (LILLEHOJ et al., 1967 a). Toxinbildende Arten der Gattungen Aspergillus und Penicillium erwiesen sich gegenüber Aflatoxin B₁ als empfindlich, wobei das Ausmaß ihrer Sensibilität und ihr jeweiliges Toxinbildungsvermögen anscheinend nicht in direkter Beziehung zueinander stand (LILLEHOJ et al., 1967 b).

Tabelle 1: Mikroorganismen mit Befähigung zur Transformation von Aflatoxinen

Mikroorganismus	Aflatoxin	chem. Reaktion	Transformationsprodukte	Autoren
<i>Nocardia asteroides</i>	B ₁	?	nicht fluoreszierende Verbindungen	ARAI et al., 1967
<i>Corynebacterium rubrum</i>	B ₁	?	nicht fluoreszierende Verbindungen	MANN und REHM, 1977
<i>Mycobacterium phlei</i>	B ₁	?	nicht fluoreszierende Verbindungen	MANN und REHM, 1977
<i>Bacillus subtilis</i>	B ₁	?	nicht fluoreszierende Verbindungen	MANN und REHM, 1977
<i>Arthrobacter variabilis</i>	B ₁	?	nicht fluoreszierende Verbindungen	MANN und REHM, 1977
<i>Flavobacterium aurantiacum</i>	B ₁	?	x	CIEGLER et al., 1966
	G ₁	?	x	CIEGLER et al., 1966
<i>Streptococcus lactis</i>	B ₁	Hydratisierung Reduktion	Aflatoxin B _{2a} Aflatoxicol	MEGALLA und MOHRAN, 1984
<i>Candida utilis</i>	B ₁	?	nicht fluoreszierende Verbindungen	MANN und REHM, 1977
<i>Candida lipolytica</i>	B ₁	?	nicht fluoreszierende Verbindungen	MANN und REHM, 1977
<i>Mucor ambiguus</i>	B ₁	Reduktion	Aflatoxicol	MANN und REHM, 1976
<i>Mucor alterans</i>	B ₁	Reduktion	Aflatoxicol	DETROY und HESSELTINE, 1969

Fortsetzung Tab.1:

Mikroorganismus	Aflatoxin	chem. Reaktion	Transformationsprodukte	Autoren
<i>Mucor griseo-cyanus</i>	B ₁	Reduktion	Aflatoxicol	DETROY und HESSELTINE, 1969
<i>Absidia repens</i>	B ₁	Reduktion	Aflatoxicol	DETROY und HESSELTINE, 1969
<i>Cunninghamella echinulata</i>	B ₁	Reduktion	Aflatoxicol	MANN und REHM, 1976
<i>Rhizopus stolonifer</i>	B ₁	Reduktion	Aflatoxicol	COLE et al., 1972
	G ₁	Ringspaltung und Decarboxylierung	Aflatoxin B ₃	COLE und KIRKSEY, 1971
<i>Rhizopus arrhizus</i>	B ₁	Reduktion	Aflatoxicol	COLE et al., 1972
	G ₁	Ringspaltung und Decarboxylierung	Aflatoxin B ₃	COLE und KIRKSEY, 1971
<i>Rhizopus oryzae</i>	B ₁	Reduktion	Aflatoxicol	COLE et al., 1972
	G ₁	Ringspaltung und Decarboxylierung	Aflatoxin B ₃	COLE und KIRKSEY, 1971
<i>Rhizopus species</i>	G ₁	Ringspaltung und Decarboxylierung	Aflatoxin B ₃	COLE und KIRKSEY, 1971
<i>Aspergillus niger</i>	B ₁	Reduktion	Aflatoxicol	MANN und REHM, 1976

Fortsetzung Tabelle 1:

Mikroorganismus	Alfatoxin	chem. Reaktion	Transformationsprodukte	Autoren
<i>Aspergillus niger</i>	G ₁	?	fluoreszierende Verbindung	CIEGLER et al., 1966
<i>Aspergillus parasiticus</i>	B ₁	?	nicht definierte Verbindungen	DOYLE und MARTH, 1978 a
	G ₁	?	nicht definierte Verbindungen	DOYLE und MARTH, 1978 a
<i>Aspergillus ochraceus</i>	B ₁	?	Aflatoxinol (?)	MANN und REHM, 1977
<i>Aspergillus terreus</i> [*]	B ₁	?	fluoreszierende Verbindungen	CIEGLER et al., 1966
<i>Aspergillus flavus</i> [*]	B ₁	?	fluoreszierende Verbindungen	CIEGLER et al., 1966
<i>Aspergillus luchuensis</i> [*]	B ₁	?	fluoreszierende Verbindungen	CIEGLER et al., 1966
<i>Penicillium raistrickii</i>	B ₁	?	fluoreszierende Verbindungen	CIEGLER et al., 1966
<i>Penicillium chrysogenum</i>	B ₁	?	2 fluoreszierende Verbindungen	MANN und REHM, 1977
<i>Penicillium islandicum</i>	B ₁	?	2 fluoreszierende Verbindungen	MANN und REHM, 1977
<i>Penicillium citreo-viride</i>	B ₁	?	2 fluoreszierende Verbindungen	MANN und REHM, 1977
<i>Trichoderma viride</i>	B ₁	Reduktion	Aflatoxinol	MANN und REHM, 1976
<i>Paecilomyces varioti</i>	B ₁	Reduktion	Aflatoxinol	MANN und REHM, 1976
<i>Stachybotrys lobulata</i>	B ₁	Reduktion	Aflatoxinol (?)	MANN und REHM, 1977

Fortsetzung Tabelle 1:

Mikroorganismus	Aflatoxin	chem. Reaktion	Transformationsprodukte	Autoren
Helminthosporium sativum	B ₁	Reduktion	Aflatoxicol	DETROY und HESSELTINE, 1969
Dactylium dendroides	B ₁	Reduktion	Aflatoxicol	DETROY und HESSELTINE, 1969
Tetrahymena pyriformis W	B ₁	?	Aflatoxicol (?)	TEUNISSON und ROBERTSON, 1967

* = Sporen

x = im Entenkükenstest nicht mehr toxisch

? = unbekannt

(?) = nicht eindeutig identifiziert

2.1.2. Ochratoxin A

Ochratoxine werden von Pilzen der Gattung *Aspergillus* und *Penicillium* gebildet und gehören zur chemischen Stoffgruppe der Dihydroisocumarine (vgl. Abb.2) (STEYN, 1971; GEDEK, 1980). Das überwiegend in Cerealien und Leguminosen nachgewiesene Ochratoxin A ist wegen seinen stark nephrotoxischen Eigenschaften der bedeutendste Vertreter dieser Toxingruppe (KROGH et al., 1979; GEDEK, 1980).

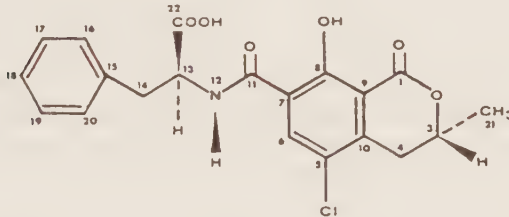


Abb.2: Chemische Struktur von Ochratoxin A

WEGST und LINGENS (1983) untersuchten den Abbau von Ochratoxin A durch das gramnegative Bodenbakterium *Phenyllobacterium immobile*. Dieser Keim besitzt die Eigenschaft Phenylalanin zu metabolisieren und wurde daher auf seine Fähigkeit getestet, den Phenylalaninanteil des Ochratoxinmoleküls für sich nutzen zu können. Kein Wachstum stellte sich ein, wenn Ochratoxin A dem Bakterium als einzige Kohlenstoff- bzw. Energiequelle angeboten wurde. Eine Zellvermehrung erfolgte nur, wenn dem Kulturmedium zusätzlich zu Ochratoxin A Phenylalanin zugesetzt worden war. Sowohl die proliferierenden als auch die nicht proliferierenden Zellen des Bakteriums bauten Ochra-

toxin A über drei Zwischenprodukte zu Ochratoxin α (7-Carboxy-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3R-methylisocoumarin) und L-Phenylalanin ab. Ochratoxin α hat sich gegenüber Hühnerembryonen wesentlich weniger toxisch als Ochratoxin A erwiesen (YAMAZAKI et al., 1971).

Welche Bedeutung gegebenenfalls den mikrobiellen Vorgängen in den Vormägen der Wiederkäuer in Bezug auf eine Entgiftung von Mykotoxinen zukommt, wurde von GALTIER und ALVINERIE (1976), HULT et al., (1976) und KIESSLING et al. (1984) untersucht. Ochratoxin A wurde im Pansen zu Ochratoxin α und Phenylalanin abgebaut. Es stellte sich jedoch dabei heraus, daß diese Leistung auf die Stoffwechselfähigkeit der Protozoen im Pansen und kaum auf die der Pansenbakterien zurückzuführen ist. An einem Schaf durchgeführte Fütterungsversuche mit einem Futtermittel, welches Ochratoxin A in einer Konzentration von 2 μ g und 5 μ g/kg enthalten hatte, ergaben, daß das Toxin bereits nach einer halben bzw. einer Stunde im Pansen-saft nicht mehr nachweisbar war oder nur noch in Spuren wiedergefunden werden konnte. Ochratoxin α jedoch ließ sich darin noch feststellen (KIESSLING et al., 1984). Bei in vitro Versuchen, die mit durch Mägenschlundsonde von Rindern gewonnenem Pansen-saft durchgeführt wurden, bestätigte sich abermals, daß eine Hydrolyse von Ochratoxin A zu Ochratoxin α stattfindet. Die Transformationsleistung vollbrachten nach Auffassung der Autoren wiederum die Protozoen (GALTIER und ALVINERIE, 1976). Andere Versuche von GALTIER und ALVINERIE (1976) mit Pansen-saft von Schlachtrindern ergaben eine Veresterung von Ochratoxin A zu Ochratoxin C; dies weist eine ähnlich hohe Toxizität wie Ochratoxin A auf (CHU und CHANG, 1971; STEYN und HOLZAPFEL, 1967). Da auch in Netz- und Blättermägen, nicht aber im Labmägen ein Abbau von Ochratoxin A zu Ochratoxin α erfolgte, wurde angenommen, daß ein Rind durch sein Vormagensystem bis zu 12 mg Ochratoxin A/kg Futter mit Hilfe seiner Mikroorganismen transformiert. Das mikrobielle Abbauvermögen des Pansen-saftes variiert in Abhängigkeit

von der Zeit der Fütterung, der Futterzusammensetzung und der Futterzubereitung (HULT et al., 1976; KIESSLING et al., 1984). Bei einer Untersuchung des Caecuminaltes von Ratten sowie eines Konzentrates aus dessen Bakterienflora und Nahrungsbestandteilen wurde ebenfalls eine Hydrolyse von Ochratoxin A zu Ochratoxin α festgestellt. Mit dem gewaschenen sterilen Überstand blieb die Reaktion aus. Von den Autoren wird vermutet, daß neben Ochratoxin α , möglicherweise sogar durch die Spaltung des Laktorrings andere, im langwelligen UV-Licht nicht mehr fluoreszierende Substanzen entstehen, die aber bislang nicht charakterisiert worden sind (GALTIER und ALVINERIE, 1976).

An der mikrobiellen Transformation von Ochratoxin A zu Ochratoxin α und L-Phenylalanin waren vermutlich Enzyme wie Diogenase und Dihydrodioldehydrogenase beteiligt (WEGST und LINGENS, 1983). Eine enzymatische Hydrolyse durch Carboxypeptidase A (PITOUT, 1969; YAMAZAKI et al., 1971; DOSTER und SINNHUBER, 1972) und α -Chymotrypsin (PITOUT, 1969) wurde bereits nachgewiesen.

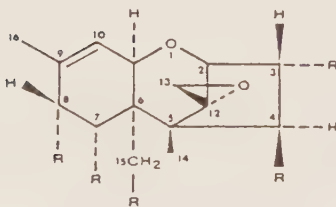
Die Überprüfung der antibiotischen Aktivität von Ochratoxin A zeigte, daß gramnegative Bakterien Mengen von einigen Hundert Mikrogramm pro Milliliter Medium tolerieren (RÖSCHENTHALER et al., 1981; 1984). Auch auf das Zellwachstum mehrerer Hefespezies hatte das Toxin keinen Einfluß (RÖSCHENTHALER et al., 1984). Dagegen besteht eine vom pH-Wert des Mediums abhängige Empfindlichkeit bei grampositiven Bakterien gegenüber Ochratoxin A (RÖSCHENTHALER et al., 1981; 1984). Untersuchungen zur Bestimmung der Sensibilität von grampositiven Bakterien gegenüber dem Toxin wurden hauptsächlich mit einigen Bacillusarten (BROCE et al., 1970; BUNGE et al., 1978; SINGER und RÖSCHENTHALER, 1978; RÖSCHENTHALER et al., 1981; BOUTIBONNES et al., 1984) und Streptococcus faecalis (HELLER und RÖSCHENTHALER, 1978; HELLER et al., 1975) durchgeführt. Mengen von 5 - 15 μ g Ochratoxin A/ml

Medium verursachten bereits eine Hemmung der Phenylalanin-tRNA- und Proteinsynthese, der Atmung, Zellwandsynthese und Versporung von *Bacillus subtilis* (WEGNER und RÖSCHENTHALER, 1978; RÖSCHENTHALER et al., 1981). Ochratoxin A führte durch eine kompetitive Hemmung der Phenylalanin-tRNA-Synthetase zu einer Verminderung der Phenylalaninacetylierung sowohl bei *Bacillus subtilis* als auch bei *Bacillus stearothermophilus* (KONRAD und RÖSCHENTHALER, 1977; BUNGE et al., 1978). Ferner erfolgte durch Ochratoxin A auch eine negative Beeinflussung der Peptidsynthese durch eine Veränderung der Magnesiumionenkonzentration in der Bakterienzelle. 12 µg von Ochratoxin A/ml Medium veranlaßten *Bacillus subtilis* zur Bildung des autolysierend wirkenden Enzyms β -Glycosidase. In Kulturen mit *Streptococcus faecalis* war eine Induktion eines derartigen Enzyms nicht festzustellen (SINGER und RÖSCHENTHALER, 1978).

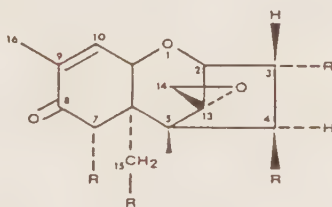
Gegenüber der Phenylalanin-tRNA-Synthetase von Hefezellen entfaltete Ochratoxin A in vitro ebenfalls eine hemmende Wirkung (CREPPY et al., 1979):

2.2. Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen und Trichothecenen

Trichothecene sind Produkte des Sekundärstoffwechsels von Fungi imperfecti der Gattungen *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* und *Stachybotrys* und zeichnen sich auf Grund ihres negativen Einflusses auf die Protein- und DNA-Synthese von eukaryontischen Zellen als stark cytotoxisch aus (UENO, 1977; MIROCHA, 1979; UENO, 1980). Sie sind eine Gruppe chemisch nahe verwandter Sesquiterpenoide mit einem Trichothecangrundgerüst. Nahezu alle natürlich vorkommenden Trichothecene weisen eine olefinische Bindung zwischen dem C-9 und C-10 Atom und eine Epoxydgruppe zwischen dem C-12 und C-13 Atom auf und werden deshalb als 12,13-Epoxytrichothec-9-ene bezeichnet (GODTFREDSSEN et al., 1967; TAMM, 1977). Nach UENO (1980) erfolgt die Einteilung der Trichothecene in Gruppe A, B, C und D, wobei sich Gruppe B von Gruppe A nur durch das Vorhandensein einer Ketogruppe am C-8 Atom unterscheidet. Trichothecene der Gruppe C sind durch zwei Epoxydgruppen und Trichothecene der Gruppe D durch ein makrocyclisches Ringsystem gekennzeichnet (vgl. Abb.3).

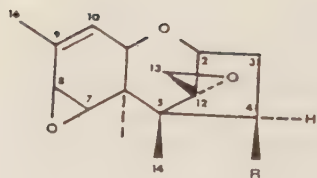


Gruppe A

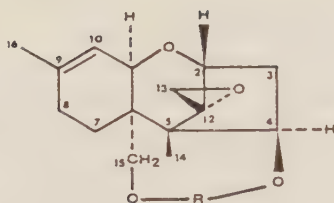


Gruppe B

Abbildung 3: Chemische Struktur der 12,13-Epoxytrichothec-9-ene



Gruppe C



Gruppe D

Fortsetzung Abbildung 3

2.2.1. 12,13-Epoxytrichothec-9-ene der Gruppe A

Auf der Suche nach Mikroorganismen mit Transformationsvermögen von T-2 Toxin wurden Pilze der Gattung *Fusarium* (YOSHIZAWA und MOROOKA, 1975 b; YOSHIZAWA et al., 1980), gramnegative und grampositive, stäbchenförmige Bakterien (UENO et al., 1983; WESTLAKE, et al., 1985) diesbezüglich überprüft.

Beim Wachstum von *Fusarium nivale* und *Fusarium solani* in Kulturen deacetylierten diese innerhalb von 24 Stunden T-2 Toxin teilweise zu HT-2 Toxin und einer nicht identifizierten Substanz mit hoher Polarität. Acetyl-T-2 Toxin wurde zu T-2 Toxin und dieses wiederum zu polaren Verbindungen wie HT-2 Toxin transformiert (YOSHIZAWA und MOROOKA, 1975 b). Zur Trichothecenbildung befähigte Stämme wie *Fusarium graminearum*, *Fusarium nivale* und *Calonectria nivalis* waren sowohl in der Lage, T-2 Toxin zu acetylieren als auch zu hydrolysieren (vgl. Tab.6). Ein Stamm der als T-2 Toxinbildner bekannten Art, *Fusarium sporotrichoides*, hydrolysierte

T-2 Toxin zu HT-2 Toxin und Neosolaniol. Bei einer Inkubation des Stammes mit HT-2 Toxin wurden keine weiteren Transformationsprodukte gefunden (YOSHIZAWA et al., 1980).

Vier Stämme des Pansenbakteriums *Butyrivibrio fibriosolvens* wurden von WESTLAKE et al. (1985) auf ihr Transformationsvermögen von T-2 Toxin getestet. T-2 Toxin wurde von allen Stämmen zu HT-2 Toxin abgebaut. Ein weiterer Stamm von *Butyrivibrio fibriosolvens* transformierte sowohl Acetyl-T-2 Toxin als auch T-2 Toxin zu HT-2 Toxin (vgl. Tab.7).

UENO et al. (1983) untersuchten zwölf grampositive, stäbchenförmige Bodenbakterien, welchen T-2 Toxin und andere Epoxytrichothecene als Kohlenstoff- bzw. Energiequellen angeboten wurden, auf ihre transformierenden Eigenschaften. Von den getesteten Mikroorganismen erwies sich vor allem *Curtobacterium* sp. Stamm 114-2 als fähig zu einer Verwertung von Trichothecenen. Der Zusatz der Toxine zum Nährmedium führte zu einer deutlichen Zellvermehrung des Bakteriums, während diese im Medium ohne Trichothecene ausblieb. Die höchste Zellvermehrung wurde eindeutig im Medium mit T-2 Toxin erzielt, während der Zusatz anderer Trichothecene eine geringere Entwicklung zur Folge hatte. Nach 24-stündiger Bebrütungszeit war bereits die Hälfte der ursprünglichen Menge an T-2 Toxin (300 mg) metabolisiert und schon nach drei Tagen kein T-2 Toxin im Kulturmedium mehr nachweisbar. Als Hydrolyseprodukte von T-2 Toxin lagen HT-2 Toxin und T-2 Triol am 3. bzw. 5. Bebrütungstag nur noch in Spuren vor. Da nach einer Woche weder Trichothecene noch verwandte chemische Verbindungen detektiert werden konnten, vermuten die Autoren eine Veränderung des Moleküls unter Spaltung des Epoxydringes (vgl. Tab.7)

Eine Deacetylierung von Neosolaniol zu T-2 Tetraol wurde von UENO et al. (1983) ebenfalls beobachtet. YOSHIZAWA et al. (1980) berichten

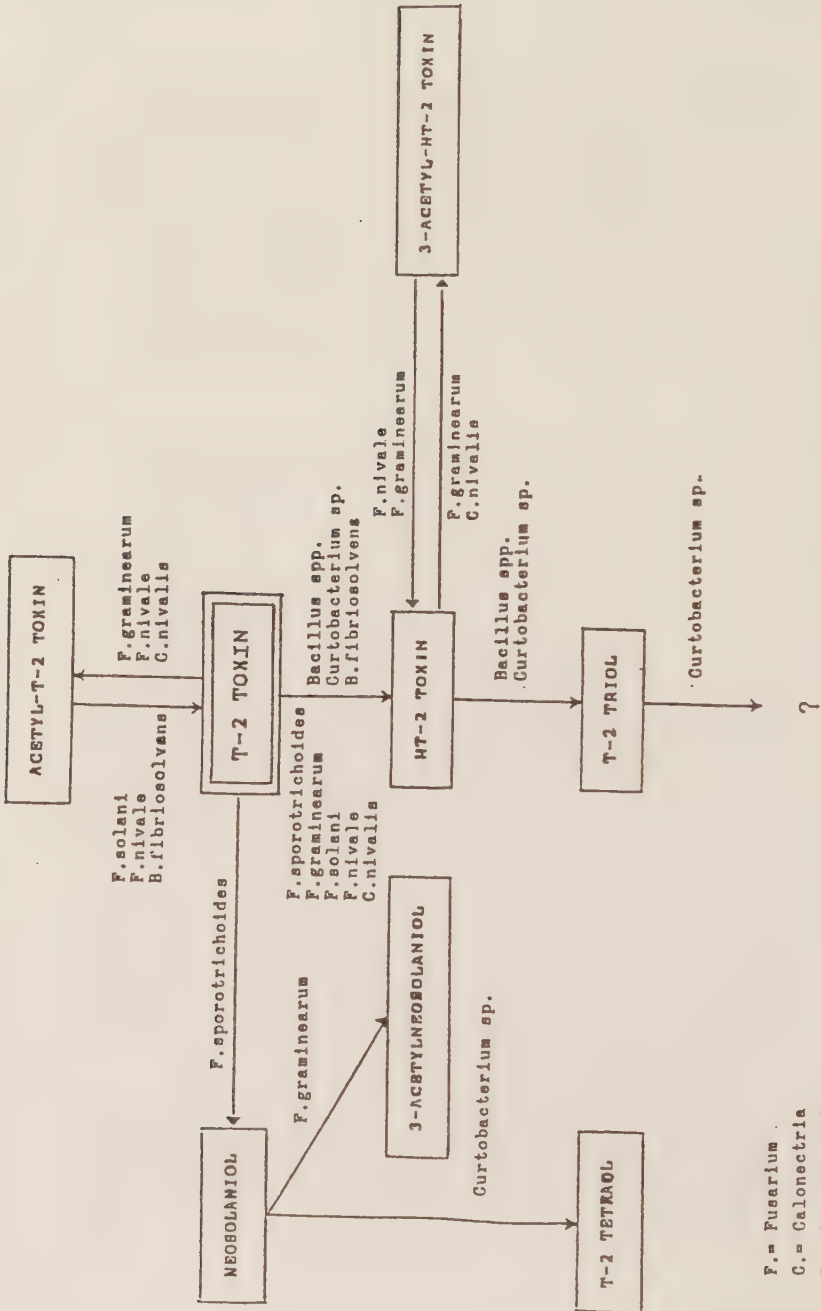


ABB. 4 : TRANSFORMATION VON T-2 TOXIN DURCH MIKROORGANISMEN

Tabelle 2: Toxizität von T-2 Toxin und dessen Transformationsprodukten gegenüber biologischen Testobjekten

Testsystem (Effekt, Maßeinheit)	Trichothecene						Autoren
	T-2 Toxin	HT-2 Toxin	T-2 Triol	Neoso- lantol	T-2 Tetraol	3-Acetyl- T-2 neosola- Toxin niol	
Maus (adult; i.p. LD ₅₀ mg/kg)	5,2	9,0	108,0	14,5 ^x	-	-	UENO et al, 1973 ; ^x UENO, 1977
Hühnerküken (Alter: 1 Tag; LD ₅₀ mg/kg)	1,75	6,25	-	-	>10,0	-	COLE et al., 1981
Hühnerembryo (LD ₅₀ µg/Ei)	0,07	0,5	-	5,0	-	-	UENO et al., 1973 zit. ICHI- NOHE et al., 1972
Meerschweinchen (Hauttoxizität; µg/Spot)	0,1	5,0	10,0	10,0	-	-	GAREIS et al., 1985
HeLa Zellen (ED ₅₀ µg/ml)	0,01	0,01	-	0,1	-	1,0	0,3 UENO, 1983 zit. TANAKA et al., 1977

Fortsetzung Tabelle 2

Testsystem (Effekt, Maßeinheit)	Trichothecene						Autoren
	T-2 Toxin	HT-2 Toxin	T-2 Triol	Neoso- laniol	T-2 Tetraol	3-Acetyl- T-2 neosola- niol Toxin	
Retikulozyten (Hemmung der Protein- synthese; ED ₅₀ µg/ml)	0,01	0,03	1,0	0,25	2,5	-	UENO et al., 1983 zit. UENO et al., 1968
Tetrahymena sp. (Hemmung der Protein- synthese; ED ₅₀ µg/ml)	0,025	0,05	1,0	-	2,5	-	UENO et al., 1983

ED₅₀ = Effektive Dosis bei 50% der Zellen

LD₅₀ = Letale Dosis bei 50% der Tiere

- = keine Angaben

von einer Acetylierung des Neosolaniols zu 3-Acetylneosolaniol durch *Fusarium graminearum*. Die verschiedenen Möglichkeiten zur Transformation von T-2 Toxin durch Mikroorganismen wurden in einer Abbildung (Abb.4) zusammengefaßt. In der Regel erwiesen sich die Transformationsprodukte von T-2 Toxin biologischen Testsystemen gegenüber (Tab.2) in geringerem Maße als toxisch.

Verschiedene Arten von Pilzen, sowie Actinomycetales Spezies und andere Bakterien wurden auf ihre Eigenschaften zur Veränderung des Moleküls von Diacetoxyscirpenol (DAS) getestet (CLARIDGE und SCHMITZ, 1978; CLARIDGE und SCHMITZ, 1979; UENO et al., 1983). Es zeigte sich, daß ruhende Zellen von *Mucor mucedo* durch Acetylierung am C-3 Atom eine Transformation des DAS herbeiführen (vgl. Tab.6). Dies war mit Scirpentriol unter gegebenen Bedingungen jedoch nicht zu beobachten. Ruhende Zellen von *Streptomyces griseus* bewirkten 15 α -Hydrolyse, und proliferierende Zellen von *Acinetobacter calcoaceticus* Hydrolysereaktionen am C-3 und C-4 Atom des Trichothecangrundgerüsts (vgl. Tab.7) (CLARIDGE und SCHMITZ, 1978). *Fusarium oxysporum* (f. sp. vasinfection) war befähigt, 3 α -Acetylierungs- und 4 β -Hydrolysereaktionen am DAS-Molekül hervorzurufen, konnte aber auch eine Hydrolyse der Esterverbindungen am C-15 Atom auslösen (vgl. Tab.6); DAS wurde zu drei isomeren Monoacetaten abgebaut (CLARIDGE und SCHMITZ, 1979). Die mikrobielle Hydrolyse von DAS zu Scirpentriol wurde von CLARIDGE und SCHMITZ (1978 und 1979) nicht beobachtet. Das *Curtobacterium* jedoch metabolisierte DAS zu Scirpentriol, unter der Voraussetzung, daß DAS als Kohlenstoff- bzw. Energiequelle im Medium zur Verfügung stand (UENO et al., 1983).

Die Möglichkeiten einer Transformation von DAS und seinen Derivaten durch verschiedene Mikroorganismen gibt Abbildung 5 wieder. Eine Gegenüberstellung der Cytotoxizität dieser Verbindungen gegenüber HeLa- und L 929-Zellkulturen erfolgte in Tabelle.3. Mit Ausnahme von

15-Acetoxyscirpen-3,4-diol erwiesen sich alle durch mikrobielle Aktivitäten aus DAS entstandenen Transformationsprodukte als geringer toxisch als DAS.

Tabelle 3: Cytotoxizität von Diacetoxyscirpenol und seinen Transformationsprodukten
(nach CLARIDGE und SCHMITZ, 1978; 1979)

Trichothecen	TD ₅₀ (µg/ml) ^x	
	HeLa	L 929
3,4,15-Triacetoxyscirpen	0,036	0,028
3,15-Diacetoxyscirpen-4-ol	0,47	0,094
3,4-Diacetoxyscirpen-15-ol	1,91	0,446
4,15-Diacetoxyscirpen-3-ol	0,0024	0,0041
15-Acetoxyscirpen-3,4-diol	0,0053	0,0097
4-Acetoxyscirpen-3,15-diol	0,074	0,077
3-Acetoxyscirpen-4,15-diol	> 0,33	-
Scirpentriol	0,088	0,108

^xTD₅₀ = Reduzierung der Proteinsynthese um 50%

- = keine Angaben

Ob Mikroorganismen auch an Detoxifizierungsprozessen von Trichothecen im Wiederkäuermagen beteiligt sind, prüften KIESSLING et al. (1984) mit Pansensaft von Schafen und Rindern. T-2 Toxin wurde durch die darin enthaltene Vormagenflora innerhalb von drei Stunden annähernd zu 50% zu HT-2 Toxin, und DAS bereits nach einer halben Stunde zu 75% zu Monoacetoxyscirpenol (MAS) deacetyliert. Die Pansenprotozoen erwiesen sich dabei wiederum über das doppel-

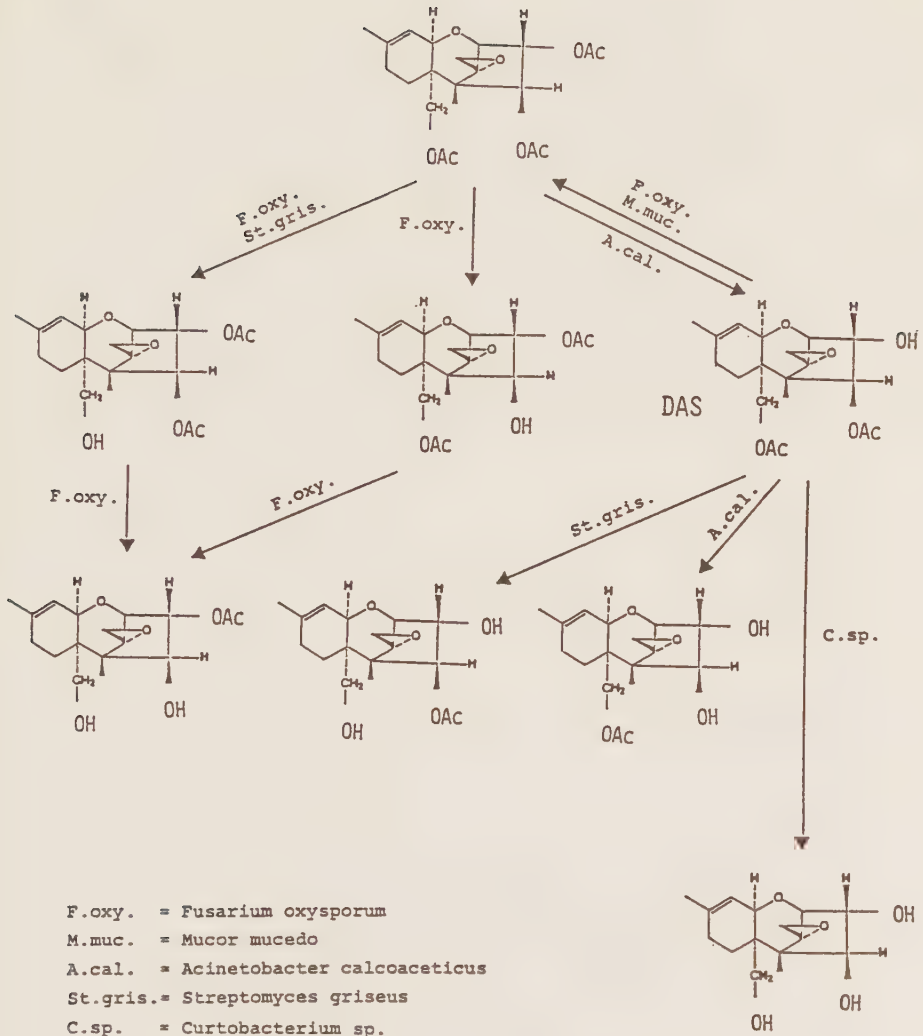


ABB. 5 : TRANSFORMATION VON 4,15-DIACETOXYSCIRPENOL (DAS)
DURCH MIKROORGANISMEN

te aktiver als Pansenbakterien (KIESSLING et al., 1984).

Wie den Ergebnissen der Untersuchungen der verschiedenen Autoren zu entnehmen war (Tab.6 und 7), scheinen Mikroorganismen bei den Trichothecen der Gruppe A (z.B. T-2 Toxin und DAS) bevorzugt Veränderungen an den Kohlenstoffatomen 3, 4, 8 und 15 herbeizuführen. Dabei zeigte sich, daß Acetylierungen nur an der C-3 Position des Trichothecangrundgerüsts stattfinden und hydrolytische Spaltungen insbesondere die Esterbindungen an den Positionen C-3 und C-4, gefolgt von C-15 betreffen. Neben der Konfiguration und Größe der verschiedenen Substituenten am Trichothecanskelett sind auch die jeweiligen spezifischen Eigenschaften der verschiedenen Mikroorganismen für die unterschiedlichen Transformationsreaktionen von Bedeutung (YOSHIZAWA und MOROOKA, 1975 b).

Für mikrobielle Acetylierungs- und Deacetylierungsreaktionen werden hauptsächlich die intrazellulären Enzyme der Mikroorganismen verantwortlich gemacht (YOSHIZAWA et al., 1980; UENO et al., 1983), wobei UENO et al. (1983) eine Beteiligung extrazellulärer Esterasen nicht ausschließen.

Neben der Befähigung der Mikroorganismen zur Transformation von 12,13-Epoxytrichothec-9-enen kann auch eine antibiotische Wirkung der Toxine diesen gegenüber beobachtet werden. Mengen von 300 µg T-2 Toxin, sowie 75 µg T-2 Tetraol und 75 µg Neosolaniol pro Testblättchen führten zu einer Wachstums hemmung von *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* bei Anwendung des Blättchendiffusionsverfahrens (BOUTIBONNES et al., 1984). Die Sensibilität gegenüber T-2 Toxin scheint eine Stammeigenschaft zu sein. Der lysogene Stamm NRRL B-3695 von *Bacillus megaterium* ist gegenüber 200 µg T-2 Toxin/Testblättchen empfindlich, *Bacillus megaterium* NRRL B-3694, dem lysogene Eigenschaften fehlen, bereits gegenüber 100 µg T-2 Toxin/Testblättchen (LILLEHOJ und CIEGLER, 1970 b).

BURMEISTER und HESSELTINE (1970) testeten 54 Bakterienstämme und 11 Pilze auf ihre Empfindlichkeit gegenüber T-2 Toxin. T-2 Toxin wirkte in einer Konzentration von 50 µg/Testblättchen nicht bakterio-statisch, hemmte aber das Wachstum von sechs Pilzarten. *Penicillium digitatum* und *Rhodotorula rubra* erwiesen sich als besonders empfindlich. Ihr Wachstum wurde bereits von 4 µg T-2 Toxin/Testblättchen beeinflusst (BURMEISTER et al., 1971). Versuche von SUKROONGREUNG et al. (1984) zeigten, daß die Sensibilität von Hefepilzen gegenüber T-2 Toxin sehr unterschiedlich ist. 8 µg T-2 Toxin/ml Medium riefen bei 35 Hefespezies keine Wachstumshemmung hervor. *Kluyveromyces fragilis*-Stämme jedoch waren gegenüber 1 - 4 µg T-2 Toxin/ml teilweise schon empfindlich. SCHAPPERT und KHACHATOURIANS (1983 und 1984) prüften den Mechanismus der antimycetischen Aktivität von T-2 Toxin in Versuchen mit den Hefespezies *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces carlsbergensis*. Unter aeroben Verhältnissen war die Wachstumshemmung durch T-2 Toxin größer als unter anaeroben Bedingungen, auch wurde die Sensibilität von der Kohlenhydratkonzentration im Nährmedium beeinflusst. Die Autoren vermuten deshalb, daß die Mitochondrien der Hefezellen durch T-2 Toxin geschädigt wurden. Auch die Permeabilität der Hefezellmembran für T-2 Toxin spielte eine wesentliche Rolle. Je durchlässiger die Zellmembran für das Toxin war, desto toxischer war die Wirkung von T-2 Toxin gegenüber der Hefezelle (SCHAPPERT und KHACHATOURIANS, 1984).

DAS besitzt geringe antibakterielle und antimycetische Eigenschaften. Einhundert Mikrogramm DAS/ml Medium konnten die Keimung der Sporen von Schimmelpilzen verschiedener Gattungen mit Ausnahme von *Penicillium digitatum* nicht verhindern (BRIAN et al., 1961). Tabelle 4 zeigt die Versuchsergebnisse von CLARIDGE und SCHMITZ (1978) über die antimycetische Wirkung von DAS und seinen Derivaten.

Zweihundert Mikrogramm DAS/ml hatten keinen wachstumshemmenden Effekt gegenüber den Bakterienarten *Bacillus subtilis*,

Tabelle 4: Antimycetische Wirkung von Diacetoxyscirpenol und seinen Transformationsprodukten
(nach CLARIDGE und SCHMITZ, 1978)

[illegible]

Salmonella dublin und *Escherichia coli* (BRAIN et al., 1961). Das Wachstum von *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* wurde in Gegenwart von 75 µg DAS/Testblättchen im Blättchendiffusions-test gehemmt (BOUTIBONNES, 1979).

Eine toxische Wirkung entfaltet DAS auch gegenüber Protozoen. Bereits 0,05 µg DAS/ml hemmten die Zellteilung von *Tetrahymena pyriformis* GL vollständig (UENO und YAMAKAWA, 1970).

2.2.2. 12,13-Epoxytrichothec-9-ene der Gruppe B und C

Untersuchungen zur Erforschung der mikrobiellen Transformation von Ketotrichotheceninen durch Pilze der Gattung *Fusarium* (siehe Tab.6) machten deren unterschiedliche Reaktionsfähigkeit deutlich. Aus 3-Acetyldeoxynivalenol entstand durch *Fusarium roseum* innerhalb von 24 Stunden 2% und durch *Fusarium nivale* 10% Deoxynivalenol, wohingegen *Fusarium solani* im gleichen Zeitraum sowohl im zuckerfreien als auch im zuckerhaltigen Czapek-Dox Medium sämtliches 3-Acetyldeoxynivalenol zu Deoxynivalenol hydrolysierte (YOSHIZAWA und MOROOKA, 1975 a). Auch erfolgte die Umwandlung von 3,4,7,15-Tetraacetylivalenol zu 4,7,15-Triacetylivalenol durch *Fusarium solani* annähernd doppelt so rasch als durch *Fusarium nivale*. Eine weitere mikrobielle Deacetylierung wurde nicht beobachtet (YOSHIZAWA und MOROOKA, 1975 b). Eine Hydrolyse der C-7 Bindung fand nur auf chemischem Wege statt (YOSHIZAWA und MOROOKA, 1975 b), auch erfolgte niemals die Bildung von Nivalenol aus Deoxynivalenol durch Oxidation am Trichothecangrundgerüst (YOSHIZAWA und MOROOKA, 1975 a).

Dem 12,13-Ethylenoxydring und der Methylgruppe am C-14 Atom wird eine Schutzfunktion gegenüber der C-4 Esterbindung zugesprochen. Die Stabilität der 4ß-Esterbindung gegenüber mikrobiellen Ein-

flüssen wird auch durch Deacetylierungsversuche von Fusarenon X zu Nivalenol bestätigt (YOSHIZAWA und MOROOKA, 1975 b).

Untersuchungen von UENO et al. (1983) zeigten jedoch, daß die geprüfte *Curtobacterium* Spezies in der Lage war, die 4B-Esterbindung zu spalten, wenn das Toxin als Kohlenstoffquelle zugegeben wurde. Das *Curtobacterium* hydrolysierte in einem Zeitraum von drei Tagen 5,88 µmol Fusarenon X pro ml Medium nahezu vollständig zu Nivalenol. Auch dieses wurde innerhalb von acht Tagen fast vollständig abgebaut. *Curtobacterium* spezies zeigte im Medium mit Nivalenol Wachstum, obwohl dieses Toxin keine Acetylreste besitzt. Es wird deshalb vermutet, daß durch das *Curtobacterium* eine Spaltung des Trichothecankerns von Nivalenol erfolgte (UENO et al., 1983).

Von einer Spaltung der C-4 Esterbindung des Ketotrichothecenes Trichothecin und des Diepoxydes Crotocin berichten auch HORVÁTH und VARGA (1961 a, b). Sie testeten das dosisabhängige Verhalten der beiden Trichothecene, welche auch Anwendung als Antimycetika finden, gegenüber drei *Aspergillus* spezies und gegenüber zwei *Penicillium* spezies. Zehn µg/Trichothecin bzw. Crotocin/ml Nährmedium verursachten bei *Aspergillus niger* und in *Penicillium chrysogenum* eine Enzyminduktion. Dieses von HORVÁTH und VARGA (1961 b) als Trichothecinase benannte Enzym führte zu einer Inaktivierung der beiden Antimycetika durch Hydrolyse der C-4 Esterbindung. Konzentrationen von 1000 µg Trichothecin bzw. Crotocin/ml Nährmedium verursachten dagegen keinen Verlust von deren biologischer Wirkung. Versuche zur mikrobiellen Transformation von Ketotrichothecen bei Verwendung von Kulturfiltraten verliefen negativ, was wiederum für eine Beteiligung intrazellulärer Enzyme am Reaktionsgeschehen spricht (YOSHIZAWA und MOROOKA, 1975 a, b).

Bei in vitro-Versuchen von KING et al. (1984) mit Pansen-saft von Rindern und bei in vivo-Versuchen mit Ratten von YOSHIZAWA et al.

(1983) entstand aus Deoxynivalenol eine neue Verbindung mit einer Doppelbindung am C-12 Atom anstelle des Epoxydringes. KIESSLING et al. (1984) konnten dies mit ihren Versuchen zur Transformation von Trichothecenen durch Pansensaft allerdings nicht bestätigen.

KING et al. (1984) vermuteten die Beteiligung einer spezifischen Epoxydreduktase bei der Transformation von Deoxynivalenol. Mikrobielle Spaltungen des 4,5-Epoxydringes (TÖMÖRKENY et al., 1969; TÖMÖRKENY et al., 1970) und des 16,17-Epoxydringes (EL-TAYEB et al., 1964) von Steroiden wurden schon mehrfach beschrieben.

Die Toxizität des Diepoxydes Crotocin und einiger Ketotrichothecene gegenüber biologischen Testobjekten gibt Tabelle 5 wieder.

Bakterien, Hefen und Schimmelpilze sind gegenüber Fusarenon X nahezu resistent (UENO et al., 1971). Die antibakterielle Wirkung von Fusarenon X wurde gegenüber *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium phlei* und *Serratia marcescens* geprüft (UENO et al., 1971; UENO et al., 1973). Konzentrationen von 5 - 25 µg Fusarenon X/ml hemmten das Wachstum der Bakterien nicht (UENO et al., 1971). 100 µg Fusarenon X/ml Medium führten zu keiner Hemmung der Proteinsynthese in *Escherichia coli* (UENO et al., 1973).

Im Zusammenhang mit der Prüfung von Fusarenon X und Trichothecin auf ihre antimycetische Wirkung, wurden drei Hefepilze getestet (UENO et al., 1971; UENO et al., 1973; SORENSON et al., 1975). 10 - 100 µg Fusarenon X/ml Medium verursachten eine leichte Hemmung der Leucinaufnahme in die Zelle von *Geotrichum candidum* (UENO et al., 1973), während 250 µg Fusarenon X/ml Medium zu einer Ausbildung von Mutanten in *Saccharomyces cerevisiae* führten, aber keinen wachstumshemmenden Effekt gegenüber dieser

Tabelle 5: Toxizität einiger 12,13-Epoxytrichothecene der Gruppen B und C gegenüber biologischen Testobjekten

Testsystem (Effekt, Maßeinheit)	12,13-Epoxytrichothecene der Gruppe								Autoren
	C	B							
	Croto- cin	Tricho- thecin	Tricho- thecol on	Fusare- non X	Nivale- nol	tetra- acetyl- nivale- nol	Deoxy- nivale- nol	3-Acetyl deoxy- nivale- nol	
Maus adult (i.p.; LD ₅₀ mg/kg)	810,0	250,0 (s.c.)	-	3,4	4,1	-	70,0	49,0	UENO, 1983 zit. UENO, 1980
HeLa Zellen (ED ₅₀ µg/ml)	0,5	0,5	-	3,1	0,3	>10,0	1,0	10,0	UENO, 1983 zit. TANAKA et al., 1977
Retikulozyten (Hemmung der Pro- teinsynthese; ED ₅₀ µg/ml)	1,0 ^x	0,15	20,0	0,25	3,0	>10,0	2,0 ^x	10,0 ^x	UENO et al., 1973; ^x UENO, 1983 zit. UENO et al., 1968

ED₅₀ = Effektive Dosis bei 50% der ZellenLD₅₀ = Letale Dosis bei 50% der Tiere

- = keine Angaben

Hefeart zeigten (UENO et al., 1971). 2 - 5 µg Trichothecin/Testblättchen erzeugten einen Hemmhof im Wachstum von *Candida albicans* im Blättchendiffusionstest (SORENSEN et al., 1975).

Die Auskeimung der Schimmelpilzsporen von *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium islandicum*, *Fusarium nivale* und *Mucor* spezies konnte durch 1 - 100 µg Fusarenon X/ml Medium nicht verhindert werden (UENO et al., 1971).

Bereits geringe Mengen Fusarenon X und Nivalenol beeinflussten die Zellteilung von *Tetrahymena pyriformis*. 5 µg Fusarenon X/ml Medium (UENO et al., 1971) bzw. 25 µg Nivalenol/ml Medium (UENO und YAMAKAWA, 1970 zit. TSUNODA et al., 1968) führten zum vollständigen Erliegen der Mitose des Ciliaten. Fusarenon X hemmte die Lipidsynthese und Phosphataufnahme von *Tetrahymena pyriformis* (CHIBA et al., 1972).

Wie aus Untersuchungen von UENO et al. (1971) hervorgeht, hemmte Fusarenon X hauptsächlich die Zellteilung von Eukaryonten und nicht von Prokaryonten. Terpenstrukturen, wie auch im Fusarenon X-Molekül enthalten, stellen Zellwandkomponenten von Eukaryonten aber nicht von Prokaryonten dar. CHIBA et al. (1972) vermuten deshalb, daß das Fehlen einer antibiotischen Wirkung von Fusarenon X auf den Aufbau der Bakterienzellwand zurückzuführen ist. Möglicherweise verhinderte die Zellwand die Penetration des Toxins (UENO et al., 1971 zit. UENO et al., 1968).

2.2.3. 12,13-Epoxytrichothec-9-ene der Gruppe D

Sehr wenige Informationen liegen vorerst über die Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen und Trichothecen der Gruppe D vor.

PAVANASASIVAM und JARVIS (1983) testeten acht Mikroorganismen (*Wojnovia graminis*, *Hypholoma* spezie, *Bacillus megaterium*, *Hendersonia acicola*, *Curvularia lunata*, *Cephalosporium acremonium*, *Rhizopus arrhizus*, *Streptomyces roseochromogenus*) auf ihr Transformationsvermögen von Verrucarin A und Verrucarin B. Nur *Rhizopus arrhizus*, *Cephalosporium acremonium* und *Curvularia lunata* verminderten die Konzentration von Verrucarin im Versuchsmedium. Bei der Inkubation von Verrucarin A mit *Rhizopus arrhizus* und *Cephalosporium acremonium* entstanden polare Verbindungen. *Rhizopus arrhizus* transformierte Verrucarin A in 16-Hydroxyverrucarin A. *Curvularia lunata* verwertete Verrucarin A sehr schnell, doch konnten keine Transformationsprodukte nachgewiesen werden. Verrucarin B wurde von *Rhizopus arrhizus* zu 16-Hydroxyverrucarin B oxidiert oder durch Spaltung der 2,3-Epoxydbindung zu 3-Hydroxyverrucarin A hydriert (siehe Tab.6).

HARRI et al. (1962) prüften die Verrucarine A, B, C und Roridin B auf ihre antibiotische Wirkung gegenüber einigen Bakterien, Hefen, Schimmelpilzen und Hautpilzen. 50 µg Verrucarin A/ml Medium hemmten zwar teilweise das Wachstum gramnegativer Keime, zeigten jedoch gegenüber grampositiven Keimen, auch Mykobakterien, keine bakteriostatische Wirkung. Die fungistatische Wirkung war gegenüber Hefepilzen stärker ausgeprägt als gegenüber Schimmel- und Hautpilzen. 0,5 µg Verrucarin A/ml führten zu einer vollständigen Wachstumshemmung von *Saccharomyces* spezie und *Candida* spezie. Verrucarin C und Roridin A waren inaktiv gegenüber Hefepilzen und Bakterien, während Verrucarin B einen schwach fungistatischen Effekt diesen gegenüber zeigte (HARRI et al., 1962).

Tabelle 6: Biotransformation von Trichothecenen durch Schimmelpilze

Mikroorganismus	Toxin	chem. Reaktion	Transformations- produkt	Autoren
<i>Fusarium solani</i>	T-2 Toxin	4ß-Hydrolyse	HT-2 Toxin u. polare Substanz	YOSHIZAWA und MOROOKA, 1975 b
	Acetyl-T-2 Toxin	3α-Hydrolyse	T-2 Toxin	
	Fusarenon X	keine Reaktion		
	3,4,7,15-Tetraacetyl- nivalenol	3α-Hydrolyse	4,7,15-Triacetyl- nivalenol	YOSHIZAWA und MOROOKA, 1975 a
	4,7,15-Triacetyl- nivalenol	keine Reaktion		
	3-Acetyldeoxynivalenol	3α-Hydrolyse	Deoxynivalenol	
	3,7,15-Triacetyldeoxy- nivalenol	3α-Hydrolyse	7,15-Diacetyldeoxy- nivalenol	
	7,15-Diacetyldeoxy- nivalenol	15α-Hydrolyse	7-Acetyldeoxynivalenol	
<i>Fusarium nivale</i> FN 28	T-2 Toxin	4ß-Hydrolyse	HT-2 Toxin u. polare Substanz	YOSHIZAWA und MOROOKA, 1975 b
	Acetyl-T-2 Toxin	3α-Hydrolyse	T-2 Toxin	
	Fusarenon X	keine Reaktion		
	3,4,7,15-Tetraacetyl- nivalenol	3α-Hydrolyse	4,7,15-Triacetyl- nivalenol	YOSHIZAWA und MOROOKA, 1975 a
	4,7,15-Triacetyl- nivalenol	keine Reaktion		
	Deoxynivalenol	3α-Acetylierung	3-Acetyldeoxynivalenol	
	3-Acetyldeoxynivalenol	3α-Hydrolyse	Deoxynivalenol	
	T-2 Toxin	3α-Acetylierung	Acetyl-T-2 Toxin	
	3-Acetyl-HT-2 Toxin	3α-Hydrolyse	HT-2 Toxin	YOSHIZAWA et al., 1980
	HT-2 Toxin	keine Reaktion		
<i>Fusarium roseum</i> no. 117	3-Acetyldeoxynivalenol	3α-Hydrolyse	Deoxynivalenol	YOSHIZAWA und MOROOKA, 1975 a
<i>Fusarium graminea-</i> <i>rum</i> ATCC 28114	T-2 Toxin	3α-Acetylierung u. 4ß-Hydrolyse	Acetyl-T-2 Toxin u. HT-2 Toxin	YOSHIZAWA et al., 1980
	3-Acetyl-HT-2 Toxin	3α-Hydrolyse	HT-2 Toxin	
	HT-2 Toxin	3α-Acetylierung	3-Acetyl-HT-2 Toxin	
	Neosolanol	3α-Acetylierung	3-Acetylneosolanol	
<i>Fusarium graminea-</i> <i>rum</i> 0588	T-2 Toxin	3α-Acetylierung	Acetyl-T-2 Toxin	YOSHIZAWA et al., 1980
	3-Acetyl-HT-2 Toxin	3α-Hydrolyse	HT-2 Toxin	
	HT-2 Toxin	3α-Acetylierung	3-Acetyl-HT-2 Toxin	
<i>Fusarium sporotri-</i> <i>choides</i> ATCC 26553	T-2 Toxin	4ß-Hydrolyse	HT-2 Toxin	YOSHIZAWA et al., 1980
	HT-2 Toxin	8α-Hydrolyse keine Reaktion	Neosolanol	

Fortsetzung Tabelle 6

Mikroorganismus	Toxin	chem. Reaktion	Transformations- produkt	Autoren
<i>Fusarium oxysporum</i> (f. sp. vasinfection) ATCC 7808	4,15-Diacetoxyscirpenol Triacetoxyscirpen	3 α -Acetylierung 15 α -Hydrolyse 4 β -Hydrolyse	Triacetoxyscirpen 3,4-Diacetoxyscirpen- 15-ol 3,15-Diacetoxyscirpen- 4-ol	CLARIDGE und SCHMITZ, 1978
	3,4-Diacetoxyscirpen- 15-ol	4 β -Hydrolyse	3-Acetoxyscirpen- 4,15-diol	
	3,15-Diacetoxyscirpen- 4-ol	15 α -Hydrolyse	3-Acetoxyscirpen- 4,15-diol	
	15-Acetoxyscirpen- 3,4-diol	keine Reaktion		
	Scirpentriol	keine Reaktion		
<i>Calonectria nivalis</i> ATCC 26559	T-2 Toxin 3-Acetyl-HT-2 Toxin HT-2 Toxin	3 α -Acetylierung u. 4 β -Hydrolyse keine Reaktion 3 α -Acetylierung	Acetyl-T-2 Toxin u. HT-2 Toxin 3-Acetyl-HT-2 Toxin	YOSHIZAWA et al., 1980
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Trichothecin (10 μ g/ml) Crotocin (10 μ g/ml)	4 β -Hydrolyse 4 β -Hydrolyse	Trichothecolon u. Iso- crotonsäure Crotocol u. Isocroton- säure	HORVÁTH und VARGA, 1961 a, b
<i>Aspergillus niger</i>	Trichothecin (10 μ g/ml) Crotocin (10 μ g/ml)	4 β -Hydrolyse 4 β -Hydrolyse	Trichothecolon u. Iso- crotonsäure Crotocol u. Isocroton- säure	HORVÁTH und VARGA, 1961 a, b
<i>Mucor mucedo</i> ATCC 7941	4,15-Diacetoxyscirpenol Scirpentriol	3 α -Acetylierung keine Reaktion	Triacetoxyscirpen Scirpentriol	CLARIDGE und SCHMITZ, 1978
<i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145	Verrucarín A Verrucarín B	Oxidation Oxidation u. 3-Hydroxy- sierung	16-Hydroxyverrucarín A 16-Hydroxyverrucarín B verrucarín A	PAVANASASIVAM und JARVIS, 1983

Tabelle 7: Biotransformation von Trichothecenen durch Bakterien

Mikroorganismus	Toxin	chem. Reaktion	Transformations- produkt	Autoren
Streptomyces griseus NRRL 3242	4,15-Diacetoxyscirpenol	15 α -Hydrolyse	4-Acetoxyscirpen- 3,15-diol	CLARIDGE und SCHMITZ, 1978
	Triacetoxyscirpen	15 α -Hydrolyse	3,4-Diacetoxyscirpen- 15-ol	
	3,15-Diacetoxyscirpen- 4-ol	keine Reaktion		
Acinetobacter calcoaceticus	4,15-Diacetoxyscirpenol	4B-Hydrolyse	15-Acetoxyscirpen- 3,4-diol	CLARIDGE und SCHMITZ, 1978
	Triacetoxyscirpen	3 α -Hydrolyse	4,15-Diacetoxyscirpenol	
Bacillus spezie	T-2 Toxin	4B-Hydrolyse	HT-2 Toxin	UENO et al., 1983
	HT-2 Toxin	15 α -Hydrolyse	T-2 Triol	
Curtobacterium spezie	T-2 Toxin	4B-Hydrolyse	HT-2 Toxin	UENO et al., 1983
	HT-2 Toxin	15 α -Hydrolyse	T-2 Triol	
Stamm 114-2	T-2 Triol	x	?	
	Neosolaniol	4B-Hydrolyse u. 15 α -Hydrolyse	T-2 Tetraol	
	4,15-Diacetoxyscirpenol	4B-Hydrolyse u. 15 α -Hydrolyse	Scirpentriol	
	Scirpentriol	x	?	
	Fusarenon X	4B-Hydrolyse	Nivalenol	
	Nivalenol	x	?	
Butyrifibrio fibriosolvens	Acetyl-T-2 Toxin	3 α -Hydrolyse	T-2 Toxin	WESTLAKE et al., 1985
	T-2 Toxin	4B-Hydrolyse	HT-2 Toxin	

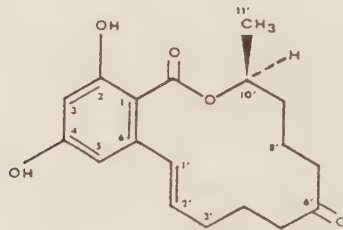
x = vermutlich Spaltung des Epoxydringes

? = unbekannt

2.3. Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen und sonstigen Mykotoxinen

2.3.1. Zearalenon

Zearalenon wird vorwiegend von *Fusarium roseum*, *Fusarium graminearum* und dessen ascosporenbildender perfekter Form *Gibberella zeae* gebildet (GEDEK, 1980; ICHINOE et al., 1983). Es entsteht hauptsächlich auf Mais und anderen Cerealien (EUGENIO et al., 1970; MIROCHA et al., 1977). Das gemäß seiner Grundstruktur zur chemischen Stoffgruppe der phenolischen Makrolide gehörende Toxin (vgl. Abb.6) ist gekennzeichnet durch eine starke östrogenartige Wirkung im Säugetierorganismus (MIROCHA et al., 1971; GEDEK, 1980).



Von Versuchen zur mikrobiellen Transformation von Zearalenon berichten PALYUSIK et al. (1980), KALLELA und VASENIUS (1982), KIESSLING et al. (1984) und RICHARDSON et al. (1984). PALYUSIK et al. (1980) testeten die Hefen *Hansenula anomala* und *Candida tropicalis* auf ihre Fähigkeit Zearalenon abzubauen, während RICHARDSON et al. (1984) *Fusarium roseum* 'Gibbosum', einen zur Zearalenon und α -Zearalenolbildung befähigten Pilz (HAGLER et al., 1979), auf diese Eigenschaft prüften. *Hansenula anomala* und *Candida tropicalis* transformierten Zearalenon zu Zearalenol, wobei sich letztere Hefeart als aktiver erwies. Nach einer Inkubationszeit von 42 Stunden waren 80% des Zearalenons durch *Candida tropicalis* zu Zearalenol umgebaut worden. Der Anteil des Reduktionsproduktes α -Zearalenol betrug 11%, der Anteil des Reduktionsproduktes β -Zearalenol 89% (PALYUSIK et al., 1980). Die östrogene Wirkung von α -Zearalenol soll nach HAGLER et al. (1979) ungefähr dreimal stärker sein als die von Zearalenon, während der östrogene Effekt von β -Zearalenol mit dem von Zearalenon nahezu identisch ist.

Eine Reduktion von Zearalenon zu Zearalenol durch *Fusarium roseum* 'Gibbosum' konnte nicht beobachtet werden. Wurde stattdessen Zearalenol als Substrat angeboten, erfolgte daraus die Bildung von Zearalenon. Innerhalb von sieben Tagen erfolgte durch *Fusarium roseum* 'Gibbosum' die Transformation von 2 Milligramm β -Zearalenol vollkommen zu Zearalenon, und innerhalb von vierzehn Tagen die von 4 Milligramm α -Zearalenol größtenteils zu Zearalenon (RICHARDSON et al. 1984).

Bei Versuchen mit Pansensaft von Schafen und Rindern konnte eine deutliche Abnahme der Zearalenonkonzentration festgestellt werden (KALLELA und VASENIUS, 1982; KIESSLING et al., 1984). KIESSLING et al. (1984) berichten, daß 2,8 mg Zearalenon/Liter Pansensaft innerhalb von 0,5 - 3,0 Stunden zu 90% zu Zearalenol reduziert wurden, wobei doppelt so viel α - als β -Zearalenol entstanden war.

KALLELA und VASENIUS (1982) konnten ebenfalls eine Verminderung des Zearalenongehaltes beobachten, geben aber keine Hinweise auf die Entstehung von Reduktionsprodukten. Panseninfusorien waren wohl größtenteils für diese Transformationsreaktion verantwortlich, während sich Pansenbakterien wiederum nahezu als inaktiv erwiesen (KIESSLING et al., 1984).

Die jeweilige Toxinkonzentration, die Zusammensetzung der Mikroflora - abhängig vom Kohlenhydratanteil der Futterration-, und die Zeit der Pansensaftentnahme nach der Fütterung hatten wesentlichen Einfluß auf die Abbaugeschwindigkeit und Restmenge von Zearalenon (KALLELA und VASENIUS, 1982; KIESSLING et al., 1984).

Untersuchungen über die antibiotische Aktivität von Zearalenon und Zearalenol wurden von BOUTIBONNES (1978) und von BOUTIBONNES et al. (1984) durchgeführt. Das antimikrobielle Spektrum von Zearalenon ist begrenzt und beschränkt sich vorwiegend auf gram-positive Bakterien. *Bacillus thuringiensis* (Berliner) erwies sich als besonders sensibel gegenüber Zearalenon. 5 und 20 µg Zearalenon/ml Flüssignährmedium induzierten eine Wachstumshemmung des *Bacillus* von 24% bzw. 52%. Morphologische Veränderungen wie Längenzunahme erfolgten bei einer Dosierung von 20 µg/ml, während 50 µg/ml eine drastische Abnahme lebender Zellen verursachten (BOUTIBONNES, 1978). 7,5 µg Zearalenol führten im Blättchendiffusionsverfahren zu einer geringeren Wachstumshemmung von *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* als 7,5 µg Zearalenon (BOUTIBONNES, 1984).

2.3.2. Patulin

Patulin wird von Arten der Gattung *Penicillium* und *Aspergillus* gebildet und gehört zur chemischen Stoffgruppe der Butenolide (KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; GEDEK, 1980). Es entsteht vor-

wiegend während des Fäulnisprozesses von Äpfeln und Birnen (HARWIG et al., 1973 a; FRANK et al., 1976). Über eine kanzerogene Wirkung von Patulin liegen widersprüchliche Angaben vor (DICKENS und JONES, 1963; ENOMOTO und SAITO, 1973; OSSWALD et al., 1978).

Patulin wird unter natürlichen Bedingungen von Hefen (HARWIG et al., 1973 a; THONART et al., 1985) und Pilzen der Gattung *Paecilomyces*, welche auch in der Lage sind, Patulin zu bilden (DUTTON et al., 1984 zit. ANDERSON et al., 1979), abgebaut. Dekontaminationsversuche wurden während der alkoholischen Gärung von Apfelsaft zu Apfelwein bzw. Apfelschnaps durch Hefen (HARWIG et al., 1973 b; STINSON et al., 1978) und während des Silierungsprozesses (DUTTON et al., 1984) vorgenommen. Eine Menge von 15 mg Patulin/l Apfelsaft wurde von sechs Weinhefen während der Fermentation von Apfelsaft zu Apfelwein vollständig abgebaut. Zwei Weinhefen, California und Steinberg, transformierten Patulin zu über 99% (STINSON et al., 1978). Untersuchungen von HARWIG et al. (1973b) ergaben jedoch, daß die Patulinkonzentration von 40 µg/ml auch im hefepilzfreien Apfelsaft abnahm und zwar innerhalb von zwei Wochen um 50%. Im Apfelsaft, welcher eine *Saccharomyces*spezies enthielt, verschwand das Toxin in dieser Konzentration im gleichen Zeitraum nahezu vollständig. SUMBU et al. (1983) und THONART et al. (1985) beobachteten, daß das Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* durch niedrige Patulinkonzentrationen zwar anfangs gehemmt wurde, nach Regeneration der Hefezellen jedoch kein Toxin mehr im Medium gefunden wurde. Welche Bedeutung dem Patulinabbau durch Hefepilze während der Silierung zugesprochen werden kann, wurde von DUTTON et al. (1984) in Versuchen mit Grassilage untersucht. 23% der Konzentration des Toxins von 10 mg Patulin/kg Grassilage verschwanden innerhalb von sechs Tagen in mit Hefen angereicherter Silage. STINSON et al. (1979) berichten, daß Patulin während der alkoholischen Gärung von Apfelsaft größtenteils zu nicht näher definierten, nicht flüchtigen,

wasserlöslichen Substanzen abgebaut wurde. Möglicherweise entstanden Spuren von Kohlendioxyd. Eine Zusammenstellung bekannter Patulinderivate erfolgte durch WALLEN et al. (1980).

Der Wirkungsmechanismus des Patulinabbaus durch Hefepilze ist nur teilweise bekannt. THONART et al. (1985) vermuten, daß bei ihren Versuchen mit *Saccharomyces cerevisiae* das Glutathion der Hefezellen für den Abbau des Toxins verantwortlich gemacht werden kann. Nach HARWIG et al. (1973b) sollen möglicherweise gewisse, während des Fermentationsprozesses durch Hefetätigkeit entstandene Metaboliten eine Patulintransformation verursachen. Wie Versuche dieser Autoren zeigten, wurden diese Metaboliten vermutlich nur in patulinhaltigem Apfelsaft gebildet. Die Abbaugeschwindigkeit des Patulins war je nach Hefespezies und Stamm verschieden, stand aber nicht im Zusammenhang mit der Anzahl der jeweiligen Hefezellen.

Es besteht eine Sensibilität sowohl bei grampositiven Bakterienarten (CHAIN et al., 1942; REISS, 1975 a, b; STOTT und BULLERMANN, 1975; STOTT und BULLERMANN, 1975 zit. KATZMANN et al., 1944, GEIGER und CONN, 1945 und ABRAHAM und FLOREY, 1949; WALLEN et al., 1980; BOUTIBONNES et al., 1984) als auch bei gramnegativen Bakterienarten gegenüber Patulin (CHAIN et al., 1942; STOTT und BULLERMANN, 1975 zit. KATZMANN et al., 1944, GEIGER und CONN, 1945 und ABRAHAM und FLOREY, 1949; WALLEN et al., 1980).

Auch hat Patulin in Abhängigkeit von der Konzentration Einfluß auf das Wachstum von Schimmelpilzen (DUTTON et al., 1984), deren Sporenbildung und Entwicklung von Hyphen sowie auf das Auftreten abnormer Hyphenformen (REISS, 1973). Das Wachstum von Hefen wird durch Konzentrationen von mehr als 10 mg Patulin/kg Silage gehemmt (DUTTON et al., 1984). THONART et al. (1985) beobachteten eine Wachstumshemmung von *Saccharomyces cerevisiae*, hervorgerufen durch 100 µg Patulin/ml Medium. Wurden die Hefepilzzellen jedoch

mit 50 µg Patulin/ml Medium inkubiert, bildeten diese anschließend eine Resistenz gegenüber einer Toxinkonzentration von 200 µg/ml Medium aus. Eine mutagene, sowie zelltötende Wirkung des Toxins auf *Saccharomyces cerevisiae* in Abhängigkeit von der Zellwachstumsphase konnten MAYER und LEGATOR (1969) nachweisen. Auch wurde die Aktivität von *Saccharomyces cerevisiae* var. *carlsbergensis* während des Fermentierungsprozesses durch 10 µg Patulin/ml Versuchsmedium beeinflusst (LAFONT et al., 1981).

Untersuchungen über das antibiotische Wirkungsprinzip von Patulin zeigten dessen atemungshemmende Wirkung auf Bakterien (CHAIN et al., 1942) und Pilze (MAYER und LEGATOR, 1969 zit. GOTTLIEB und SINGH, 1964). Durch das Toxin wurde die Aufnahme von Sauerstoff in die Bakterienzelle verhindert (CHAIN et al., 1942). Die mutagene Wirkung von Patulin gegenüber *Saccharomyces cerevisiae* kann möglicherweise auf eine Inaktivierung einer oder mehrerer Enzyme der Atmungskette zurückzuführen sein (MAYER und LEGATOR, 1969). Auch wirkten sich geringe Mengen Patulin negativ auf die Glutathionkonzentration in den *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen aus (THONART et al., 1985).

2.3.3. Rubratoxine

Die vorwiegend von *Penicillium rubrum* gebildeten Rubratoxine gehören zur chemischen Stoffgruppe der Nonadride und sind vorwiegend in pflanzlichen Produkten anzutreffen (GEDEK, 1980). Versuche zum Abbau von Rubratoxin wurden hauptsächlich mit *Penicillium rubrum*-Kulturen durchgeführt (EMEH und MARTH, 1976; ROBINSON und EMEH, 1976; EMEH und MARTH, 1978). EMEH und MARTH (1976) testeten fünf *Penicillium rubrum*-Stämme auf ihr Vermögen, selbst gebildetes Rubratoxin A und B wieder abzubauen. Nach maximaler Toxinproduktion erfolgte eine Abnahme der Toxinkonzentration im Nährmedium, wobei die Toxinmenge stärker reduziert wurde als das Pilzwachstum.

Mit steigendem pH-Wert des Versuchsmediums (ROBINSON und EMEH, 1976), zunehmendem Alter der Kulturen und Dauer der Inkubationszeit (ROBINSON und EMEH, 1976; EMEH und MARTH, 1978) stieg die Transformationsfähigkeit der Schimmelpilze an. Sieben Tage alte Kulturen von *Penicillium rubrum* verminderten innerhalb von 24 Stunden die Konzentration von Rubratoxin A, verglichen mit der Konzentrationsminderung von Rubratoxin B, um das doppelte. Mit zunehmendem Alter der Kulturen und Dauer der Inkubationszeit schien sich diese anfänglich stärkere Transformationsfähigkeit jedoch anzugleichen (EMEH und MARTH, 1978).

Bei Erschöpfung der Nährstoffe des Mediums transformierten *Penicillium rubrum*-Kulturen Rubratoxin vermutlich, um aus den Abbauprodukten Nutzen für ihren Stoffwechsel ziehen zu können (EMEH und MARTH; 1976).

Aus der zur Verfügung stehenden Literatur gingen keine Angaben über die antibiotische Aktivität von Rubratoxin A hervor. Rubratoxin B erzeugte in einer Konzentration von 450 µg/Testblättchen eine Wachstumshemmung von *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* im Blättchendiffusionstest (BOUTIBONNES et al., 1984). REISS (1972) prüfte sieben Schimmelpilzkulturen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Rubratoxin B. Auf unterschiedliche Weise schädigte Rubratoxin B die Hyphen von drei Schimmelpilzen. 100 µg Toxin/ml Nährsubstrat induzierten in *Aspergillus niger* und *Aspergillus flavus* die Bildung geschwollener, stark segmentierter Hyphen oder die Formation von Riesenzellen. Die Hyphen von *Aspergillus niger* rupturierten häufig. Aus *Rhizopus nigricans*-Sporen wuchsen kurze, unregelmäßig geformte Keimschläuche. Die Versporung aller Schimmelpilze wurde durch 100 µg Rubratoxin B/Testblättchen vollständig gehemmt.

Der Autor vermutete, daß die toxische Wirkung von Rubratoxin B auf einer Schädigung der Hyphenenden durch Beeinflussung der Zellwandsynthese beruht.

2.3.4. Gliotoxin

Untersuchungen von BREWER und TAYLOR (1967) zeigten, daß die Konzentration von Gliotoxin, einem zur chemischen Gruppe der Epidithiadiketopiperazine gehörenden Metabolit von Pilzen der Gattung *Penicillium*, *Aspergillus* und *Trichoderma* (BREWER und TAYLOR, 1967 zit. LOWE et al., 1966; COLE und COX, 1981 zit. JOHNSON et al., 1943 und WILKINSON und SPILSBURG, 1965), in Anwesenheit atmender Zellen von *Bacillus subtilis* linear mit der Inkubationszeit abnahm. Die Abbaurrate war abhängig von der Anzahl der Bakterienzellen, dem pH-Wert und dem zur Verfügung stehenden Stickstoff im Nährmedium, jedoch unabhängig von der Toxinkonzentration.

Es liegen noch keine Kenntnisse über den Mechanismus der biologischen Gliotoxintransformation vor. BREWER und TAYLOR (1967) vermuteten jedoch, daß *Bacillus subtilis* die Disulfidbindung des Gliotoxinmoleküls enzymatisch angreift. Für eine Beteiligung von Enzymen spricht die Tatsache, daß auch nach Entfernen der Bakterienzellen aus dem Nährmedium weiterhin ein Abbau erfolgte (BREWER und TAYLOR, 1967).

Eine Vielzahl von Autoren berichten von der antibiotischen Aktivität von Gliotoxin. Auf das Wachstum von Bakterien wirkte Gliotoxin bakteriostatisch (WAKSMANN und WOODRUFF, 1942; TAYLOR, 1971 zit. BEECH und CARR, 1955, WRIGHT, 1954 und NEMEC et al., 1960). Gegenüber Pilzen hatten Gliotoxine ebenfalls wachstumshemmende Eigenschaften (TAYLOR, 1971 zit. FALCK, 1931, JONES und HARPER, 1952, NEMEC et al., 1960, PARAG, 1961).

Die Disulfidbindung des Gliotoxinmoleküls ist essentiell für dessen antibiotische Wirkung (BREWER und TAYLOR, 1967 zit. BREWER et al.

1966). Der Mechanismus dieser Antibiose ist noch weitgehend unerforscht (TAYLOR, 1971). Es konnte jedoch eine Hemmung der Nukleinsäuresynthese bei *Saccharomyces carlsbergensis* festgestellt werden (TAYLOR, 1971 zit. KERRIDGE, 1958).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Herkunft

3.1.1. Mikroorganismen

Bakterien

<u>grampositive Kokken</u>	9 Stämme
darunter	
Staphylococcus aureus	3 Stämme
Staphylococcus sciuri	1 Stamm
Staphylococcus xylosus 2	1 Stamm
Streptococcus faecium	2 Stämme
Streptococcus faecium subsp. durans	1 Stamm
 <u>grampositive Stäbchenbakterien</u>	 20 Stämme
darunter	
Lactobacillus acidophilus	1 Stamm
Bacillus megaterium	1 Stamm
Bacillus subtilis	1 Stamm
Bacillus subtilis var. mycoides	1 Stamm
Bacillus cereus	1 Stamm
Nocardia sp.	1 Stamm
 <u>gramnegative Stäbchenbakterien</u>	 16 Stämme
darunter	
E. coli	2 Stämme
Citrobacter freundii	1 Stamm
Enterobacter agglomerans	1 Stamm
Erwinia spp.	4 Stämme
Pseudomonas fluorescens	1 Stamm

Algen, chlorophyllfrei

Prototheca spp. 2 Stämme

Hefen und hefeähnliche Pilze 6 Stämme

nämlich

Candida albicans 1 Stamm

Candida krusei 1 Stamm

Candida pseudotropicalis 1 Stamm

Brettanomyces lambia 1 Stamm

Rhodotorula sp. 1 Stamm

Endomyces lactis 1 Stamm

Schimmelpilze 5 Stämme

nämlich

Aspergillus flavus 1 Stamm

Aspergillus niger 1 Stamm

Eurotium sp. 1 Stamm

Penicillium sp. 1 Stamm

Fusarium acuminatum 1 Stamm

Die Bakterien waren entweder aus Futtermitteln oder aus klinischem Material (Hautproben und Faeces) isoliert worden. Die Algen und Pilze stammten aus der Stammsammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Universität München. Ihre Zuordnung zu den einzelnen Keimgruppen erfolgte nach den hierfür anerkannten Kriterien der Systematik, teilweise unter Anwendung von biochemischen Testverfahren zur Bestimmung der Artzugehörigkeit (Bergey's Manual, 1984; Winkle, 1979).

Für die Auswahl der in die Prüfung einbezogenen Stämme war ihre Beteiligung am natürlichen Keimbefall von Futtermitteln und die Ver-

wendung als Futterzusatz für die Regulierung der Darmflora maßgeblich. Darüberhinaus wurden auch Keime der Darmflora geprüft, die gelegentlich Futtermittel durch faecale Verunreinigung kontaminieren.

3.1.2. Substrate

Kulturmedien

Fleischextrakt-Pepton-Agar (OXOID, Art. CM 55)
Sabouraud-Dextrose-Agar (MERCK, Art. 7315)
Standard-I-Bouillon (MERCK, Art. 7883), pH 7,5
Standard-I-Bouillon, alkalisiert mit 1n NaOH (MERCK, Art. 9137), pH 9,2

Medium nach UENO et al. (1983), pH 6,0 bestehend aus:

NH_4NO_3 4 g; KH_2PO_4 1,5 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ 1,5 g; $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,001 g; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,2 g; $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 0,01 g; Hefeextrakt 0,5 g;
Aqua dest. ad 1000 ml.

Futtermittel

Mischfutter 3 Alleinfuttermittel in Mehlform
Grünmais kurz gehexelt

Die drei Futtermittel stammten aus dem Diagnostikmaterial des Institutes, der Grünmais aus der Bayerischen Landesanstalt für Tierzucht in Grub.

3.1.3. Toxine

T-2 Toxin	(SIGMA, Nr. T-4887)
Diacetoxyscirpenol	(SIGMA, Nr. D-0761)
HT-2 Toxin	(SIGMA, Nr. T-4138)
T-2 Triol	(SIGMA, Nr. T-4013)
T-2 Tetraol	(SIGMA, Nr. T-3888)
Neosolaniol	(SIGMA, Nr. N-1761)
Monoacetoxyscirpenol	(eigene Herstellung; 15-Acetoxyscirpendiol)
Scirpentriol	(eigene Herstellung)

Sechs der Toxine konnten käuflich erworben werden; zwei Toxine, nämlich Monoacetoxyscirpenol und Scirpentriol wurden durch ammoniakalische Hydrolyse aus Diacetoxyscirpenol (PATHRE et al., 1976) hergestellt. Die Identität der Toxine wurde massenspektrometrisch abgesichert.

3.2. Methoden

3.2.1. Prüfung von Bakterien, Algen, Hefen und Schimmelpilzen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol

Die Prüfung der Keime erfolgte im Agarlochtest.

3.2.1.1. Herstellung der Keimsuspensionen und Beimpfung der Testplatten

Zur Herstellung der Keimsuspensionen für die Beimpfung der Testplatten wurden die 45 in die Empfindlichkeitsprüfung einbezogenen

Bakterienstämme 18 Stunden bei 37°C in Standard-I-Bouillon vor-kultiviert. Im Anschluß daran wurden die Bouillonkulturen jeweils im Verhältnis 1:1 mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und mit jedem Stamm acht Fleischextrakt-Pepton-Agarplatten mit der Öse dicht beimpft (Impfmenge pro Platte ca. 20 µl). Der-gleichen wurde mit den Algen (2 Stämme) und hefeartigen Pilzen (6 Stämme) verfahren. Ihre Vorkultur erfolgte in Sabouraud-Flüssig-medium (OXOID, Art. CM 147). Diese wurde mittels Öse auf Sabou-raud-Dextrose-Agarplatten aufgebracht und mit einem sterilen Drygalskispatel verteilt. Die fünf Stämme der Schimmelpilze wurden zuerst auf Sabouraud-Dextrose-Schrägagar 18 Stunden bei 37° C angezüchtet und zur Bildung von Sporen zehn Tage bei Zimmer-temperatur aufbewahrt. Die Sporen wurden jeweils mit 5 ml steriler, physiologischer Kochsalzlösung und einer sterilen Pipette vor-sichtig vom Pilzrasen abgelöst und mit jeweils 0,1 ml der Sporen-suspension, entsprechend ca. 6×10^5 Sporen, insgesamt acht Sabou-raud-Dextrose-Agarplatten je Stamm beimpft. Das Inokulum wurde wiederum wie bei den Algen und hefeartigen Pilzen mit einem sterilen Drygalskispatel auf der Nährbodenoberfläche gleichmäßig verteilt.

3.2.1.2. Beschickung der Testplatten mit Toxinen

Die Empfindlichkeit der Mikroorganismen gegenüber den Trichothecenen T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol (DAS) wurde jeweils gegenüber sieben Konzentrationen der Toxine überprüft.

Dazu wurde das reine Standardtoxin jeweils in Aqua dest. aufgenom-men und Verdünnungsreihen mit dem Faktor 2 hergestellt. Als Lösungs-vermittler diente bei den Ausgangstoxinlösungen Dimethylsulfoxid (DMSO; MERCK, Art. 2931; Anteil 2%). Der Toxinanteil der Ausgangslösungen betrug 500 µg T-2 Toxin bzw. DAS/ml. Da in die Stanzlöcher im Agar jeweils nur 0,2 ml von den im Verhältnis 1:1 verdünnten Toxinlösungen gegeben wurde, waren die Keime gegenüber folgenden Konzentratio-

nen der Toxine exponiert, nämlich 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 und 1,562 µg/Loch. Eine Testplatte diente jeweils zur Überprüfung der Wirkung des Lösungsmittels Aqua dest. mit dem Lösungsvermittler DMSO in der höchsten Konzentration von 2% auf die Keime.

Das Loch wurde jeweils nach Beimpfung der Agarplatten (Schichtdicke 4 mm) mit Bakterien, Algen und Pilzen mit einem scharfkantigen, sterilen Glasrohr ($\phi = 110$ mm) aus der Mitte des Agars gestanzt und dieser unter Wahrung steriler Kautelen entfernt.

3.2.1.3. Wachstumsbedingungen und Beurteilung

Alle Platten wurden zunächst 18 Stunden bei 37°C bebrütet und dann noch je nach Zugehörigkeit der Keime zu Bakterien, Algen, Hefen und Schimmelpilzen über einen Zeitraum von zwei bis acht Tagen bei Zimmertemperatur gelagert.

Die Beurteilung des Wachstums erfolgte bei den Bakterienstämmen am 1., 2. und 3. Tag nach der Exposition der Keime gegenüber den Toxinen, bei den Algen und hefeartigen Pilzen dagegen am 1., 2., 3., 4., 5., und 9. Tag und bei den Schimmelpilzen am 1., 2., 3. und 7. Tag der Bebrütung. Je nach Wachstum der Keime in Abhängigkeit von der Zeit und der Toxinkonzentration wurden die geprüften Mikroorganismen als empfindlich, mäßig empfindlich und resistent gegenüber den getesteten Trichothecenen eingestuft. Als sensibel wurden die Keime eingestuft, deren Wachstum um das Stanzloch vollständig gehemmt war; mäßig sensibel waren diejenigen Mikroorganismen, deren Kolonienwachstum in Stanzlochnähe geringere Größe und Farbtintensität zeigte, und als resistent galten die Keime, bei deren Wachstum in Stanzlochnähe und in weiterer Entfernung kein Unterschied zu verzeichnen war und es außerdem in Öppigkeit und Farbtintensität dem Wachstum auf der Kontrollplatte entsprach.

3.2.2. Untersuchungen zur Transformation von T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol

3.2.2.1. In Kulturmedien

Da den Mikroorganismen im Boden sowie in Produkten pflanzlichen und tierischen Ursprungs stets eine Vielzahl an Kohlenstoffquellen zur Verfügung steht, erfolgte die Prüfung der Keime in Standard-I-Bouillon. In Anlehnung an die Untersuchungen von UENO et al. (1983) mit *Curtobacterium* spezieis in einem kohlenstoff- und energiearmen Medium wurde eine Auswahl von Bakterien auch in diesem getestet. Zur Kontrolle des Einflusses anderer Faktoren auf die Toxine wurden die mit Toxin versetzten Medien auch ohne Zusatz von Keimen unter gleichen Bedingungen gehalten und wie die keimbelasteten Ansätze behandelt und analysiert.

3.2.2.1.1. Versuchsanordnung und -durchführung

Für die Beimpfung der Medien wurden Bakteriensuspensionen von 19 Stämmen (Bakterienstämme siehe Tab. 11, 12 und 13) hergestellt. Dazu erfolgte zunächst die Bebrütung jeweils einer Einzelkolonie des zu prüfenden Stammes in Standard-I-Bouillon für 18 Stunden bei 37°C. Die Bouillonkultur wurde zentrifugiert, der Überstand dekantiert, und der Bodensatz in steriler, physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Die Dichte der Bakteriensuspension entsprach einer Bariumsulfataufschwemmung von 97:3 und ergab bei Anwendung von Oberflächenverfahren zur Keimzählung einen Gehalt von $1,0 - 7,5 \times 10^7$ lebensfähigen Bakterien pro Milliliter. Die Lösung der Toxine erfolgte in Methanol (MERCK, Art. 6012). Die T-2 Toxin- und die DAS-Lösung wurde nach einer Konzentrationseinstellung auf 500 µg/ml durch mit Methanol vorbehandelte Millex

GS-Filter MILLIPORE, Art. SLGS 025 BS, Porengröße 0,22 μm) filtriert.

Für einen Versuchsansatz wurden jeweils drei Schraubflaschen (Fassungsvermögen 200 ml) mit einem Inhalt von 100 oder 140 ml autoklavierter Standard-I-Bouillon (pH 7,5) verwendet. Diesen wurden 1,0 bzw. 1,4 ml Bakteriensuspension zugesetzt. Jeweils zwei der drei Schraubflaschen wurden zusätzlich mit Toxin versetzt, sodaß die Toxinkonzentration 10 $\mu\text{g/ml}$ T-2 Toxin bzw. DAS betrug.

Als keimfreie Kontrollen dienten drei Schraubflaschen (Fassungsvermögen 120 ml) mit 25 ml autoklavierter Standard-I-Bouillon (pH 7,5), von welchen zwei Flaschen mit T-2 Toxin (10 $\mu\text{g/ml}$) bzw. DAS (10 $\mu\text{g/ml}$) versetzt wurden.

Zur Kontrolle des Einflusses der pH-Verschiebung in den alkalischen Bereich erfolgte ein Ansatz in drei Schraubflaschen (Fassungsvermögen 200 ml) mit jeweils 140 ml autoklavierter Standard-I-Bouillon (pH 9,2), von welchen zwei mit Toxin versetzt wurden (10 $\mu\text{g/ml}$). Bakterien wurden nicht zugegeben.

Zwei der grampositiven (*Bacillus subtilis* var. *mycoides*, Stamm 210; *Lactobacillus acidophilus*, Stamm 2) und der gramnegativen Stäbchenbakterien (*E. coli*, Stamm 1; *Erwinia* sp., Stamm 220)

wurden zusätzlich im Medium nach UENO et al. (1983) auf ihr Transformationsvermögen geprüft. Die Keime wurden in Standard-I-Bouillon angezüchtet, die Bouillon abzentrifugiert und der Bodensatz durch zweimaliges Aufschwemmen und Zentrifugieren mit physiologischer Kochsalzlösung von Bouillonrückständen befreit. Desweiteren wurde verfahren wie bereits beschrieben, den Keimen wurde lediglich ein anderes Substrat angeboten.

Die Bebrütung der Standard-I-Bouillon erfolgte unter konstantem, leichtem Schütteln (Schüttler BULHER KS 10) bei 20°C, ausgenommen die Ansätze mit Faecalkeimen, die bei 37°C bebrütet wurden. Die Bewegung dieser Flaschen erfolgte mehrmals täglich von Hand. Alle Ansätze mit dem Medium nach UENO et al. (1983) wurden ebenfalls bei 37°C bebrütet. Durch Lockerung des Schraubdeckels war gewährleistet,

daß Luftsauerstoff hinzutreten konnte. Die Ansätze wurden durch Umwicklung mit Alufolie vor direktem Lichteinfall geschützt. Für die Mykotoxinanalyse erfolgte eine Probenentnahme von 20 ml am 3., 7., 10., 14., 17. und 21. Tag (Einzelheiten siehe Tab. 11, 12 und 13). Gleichzeitig wurde jeweils das pH des Mediums mit Indikatorstäbchen (MERCK, Art. 9542 und 9543) und die Reinheit und Vitalität der Keime durch Anlegen von Subkulturen überprüft. Bei den Ansätzen ohne Keime wurde eine Prüfung auf Sterilität durchgeführt.

3.2.2.1.2. Mykotoxinanalyse

3.2.2.1.2.1. Extraktion

Die für die Mykotoxinanalyse entnommenen Proben wurden jeweils zweimal mit 50 ml Ethylacetat (MERCK, Art. 9693) ausgeschüttelt. Nach Vereinigung der Auszüge wurden diese im Rotationsverdampfer konzentriert, über Ethylacetat getränkte Watte in kleine Schraubflaschen (Fassungsvermögen 5 ml) überführt und unter dem Abzug eingedampft.

3.2.2.1.2.2. Physikalisch-chemische Nachweisverfahren

Die physikalisch-chemische Analyse erfolgte hauptsächlich dünn-schichtchromatographisch, aber auch gaschromatographisch, teilweise ergänzt durch Massenspektrometrie.

Alle für die Untersuchungen verwendeten Lösungsmittel hatten p.a. Qualität.

Alle Extrakte der Versuchsansätze in Standard-I-Bouillon und im Medium nach UENO et al. (1983) wurden mittels eindimensionaler Dünnschichtchromatographie (DC) auf ihren Toxingehalt untersucht. Der Toxinnachweis erfolgte sowohl qualitativ als auch semiquantitativ durch Vergleich mit Standardtoxin unter UV-Licht. Traten bei der

Auftrennung der Extrakte auf der dünnschichtchromatographischen Platte interferierende Substanzen auf, wurde die zweidimensionale DC, bei welcher die DC-Platten in zwei unterschiedlich polaren Fließmitteln entwickelt werden (PATTERSON und ROBERTS, 1979; BAUER, 1980), durchgeführt.

Es wurden DC-Fertigplatten (Kieselgel 60, Schichtdicke 0,25 mm ohne Fluoreszenzindikator; MERCK, Art. 5721) verwendet. Bei der dünnschichtchromatographischen Auswertung der mit T-2 Toxin kontaminierten Proben wurden die DC-Platten in Toluol/Ethylacetat/Ameisensäure (6:3:1; v/v) entwickelt, im Falle einer zweidimensionalen Auswertung, anschließend in Toluol/Aceton (3:2; v/v).

Die Auftrennung der mit DAS kontaminierten Proben erfolgte in Toluol/Aceton, bei zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie in Chloroform/Methanol (34:3; v/v).

Die Extrakte wurden jeweils in 1000 µl Chloroform aufgenommen und davon eine Menge von 25 µl entsprechend 0,5 ml der Probe nebeneinander auf die DC-Platte aufgetragen. Zur semiquantitativen Bestimmung der Toxinkonzentrationen wurden Mischstandards aus T-2 Toxin, HT-2 Toxin, T-2 Triol, T-2 Tetraol und aus DAS, Monoacetoxyscirpenol (MAS), Scirpentriol (SCT) in den Konzentrationen 5 µg, 4 µg, 3 µg, 2 µg, 1 µg pro 25 µl Chloroform hergestellt und parallel zu den Probenextrakten auf die DC-Platte gebracht. Zur Kontrolle wurde auch der zu Versuchsende gewonnene Extrakt aus den Bakterienkulturen ohne Toxinzusatz mitgeführt. Als weitere Kontrollen dienten die Extrakte aus mit Toxin versetzter, keimfreier Standard-I-Bouillon mit pH 7,5 und 9,2.

Nach Besprühen der in den Fließmitteln entwickelten und getrockneten Platten mit 25% iger Schwefelsäure (MERCK, Art. 716) und Erhitzen für einige Minuten bei 110 - 120°C wurde die qualitative und quantitative Auswertung unter UV-Licht vorgenommen (Wellenlänge:

254 nm und 366 nm) (UENO, 1973).

Zur Bestätigung des dünnschichtchromatographischen Ergebnisses erfolgte teilweise eine Überprüfung mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie. Für die gaschromatographische Analyse stand ein Gerät der Firma CARLO ERBA (Fractovap 4200), ausgestattet mit Flammenionisationsdetektor, zur Verfügung. Die Trennung der Substanzgemische erfolgte an Fused Silica Kapillarsäulen (SE 54, 30 m x 0,32 mm oder DB-5, 15 m x 0,25 mm) bei einer Injektortemperatur von 215°C und einem Temperaturprogramm von 140°C (3 min) bis 240°C mit 10°C/min und von 240°C bis 280°C mit einer Aufheizrate von 4°C/min. Als Trägergas diente Helium (0,6 kg/cm²). Die Aufzeichnung der Chromatogramme übernahm ein Mega series Integrator (SPECTRA PHYSICS, SP 4270).

Die Extrakte wurden dazu folgendermaßen aufbereitet: jeweils 0,25 ml Probenaliquot wurden mit 30 µl N-Methylbis(trifluoracetamid) (MBTFA, MERCK, Art. 11817) 30 Minuten bei 60°C derivatisiert und 1 µl davon in den Gaschromatographen injiziert. Die qualitative Analyse erfolgte durch Retentionszeitenvergleich der Probenpeaks mit denen der Toxinstandards sowie durch Coinjektion von Probe und Standard (GAREIS, 1983; GAREIS et al., 1985).

Verschiedentlich wurden die dünnschichtchromatographischen und gaschromatographischen Analysenergebnisse ergänzend dazu auch noch mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS; FINNIGAN MAT, Bremen, 1020) (siehe Tab.2) bestätigt. Die GC-Parameter entsprachen den vorher beschriebenen. Als Kriterien für eine Identifizierung der Toxinedienten der Nachweis charakteristischer Ionen, deren relative Intensitäten und die Übereinstimmung der Retentionszeit mit der des entsprechenden Standardtoxins (GAREIS et al., 1985).

3.2.2.2. In Futtermitteln

Um den Einfluß der Mikroflora von Futtermitteln während der Lagerung oder Silierung auf die Transformation von Trichothecenen zu prüfen, wurden drei, durch Voruntersuchungen überprüfte und als toxinfrei gewertete Mischfuttermehle und kurz gehexelter Grünmais mit T-2 Toxin und DAS versetzt und unterschiedlich lange gelagert oder siliert. Die Silierung des Grünmaises wurde an der Bayerischen Landesanstalt für Tierzucht vorgenommen.^x

3.2.2.2.1. Versuchsanordnung und -durchführung

3.2.2.2.1.1. Mischfutter

Bei den Mischfuttermehlen wurde zunächst der Wassergehalt durch Bestimmung des Rohwassers nach der Weender Analyse (KIRCHGESSNER, 1975) überprüft. Danach wurde durch Hinzufügen von Aqua bidest. bei zwei Mischfuttermehlen (FM 291/83 und FM 79/84) der Feuchtigkeitsgehalt auf 19% und bei einem Mischfuttermehl (FM 78/84) auf 30% eingestellt. Für die FM 291/83 und 78/84 wurden die Toxine in DMSO gelöst und zur gleichmäßigen Verteilung fünf Minuten mit Ultraschall behandelt. Die Toxine wurden zusammen mit dem Aqua bidest. dem Futter zugesetzt, wobei bezogen auf das Wasser der Anteil des Lösungsvermittlers DMSO 2% betrug. Die Lösung der Toxine für das FM 79/84 erfolgte in Propylenglycol, unterstützt durch Beschallen im Ultraschallbad. Die Hinzufügung der gelösten Toxine zum Futtermittel wurde ebenfalls mit dem Zusatz von Aqua

^x Herrn Dr. Groß und Herrn Gartner danke ich recht herzlich für die hilfreiche Beratung und die Durchführung der Silierung.

bideist. zur Erhöhung des Wassergehaltes vorgenommen. Die Menge an Propylenglycol betrug im Futtermittel 1 oder 2%, da Doppelsätze hergestellt wurden. Es sollte damit erreicht werden, daß durch den Propylenglycolzusatz das FM 79/84 mit einem Wassergehalt von 19% während mehrwöchiger Lagerung langsamer dem Verderb unterlag und dadurch die Transformation der Toxine über einzelne Zwischenprodukte leichter verfolgt werden konnte.

Um eine Kontrolle über die mikrobiellen Umsetzungen zu haben, wurde ein Teil der mit Toxin versetzten Futtermittel zur Abtötung der futtermitteleigenen Flora autoklaviert. Später erfolgte bei den Analysen jeweils der Vergleich des Toxingehaltes von sterilisiertem und nicht sterilisiertem Futter.

Als weitere Kontrolle wurde auch Probenmaterial angesetzt, bei welchem nur der Wassergehalt erhöht, aber kein Toxin zugesetzt worden war.

Die Konzentration von T-2 Toxin bzw. DAS betrug bei den mit Toxin versetzten Futtermitteln 1 µg/g.

Mit je 60 g Futter wurden Schraubflaschen mit 250 ml Fassungsvermögen gefüllt. Durch Lockerung des Deckels konnte zu allen Ansätzen Luft hinzutreten.

Die Versuchsansätze mit FM 291/83 und FM 78/84 wurden über einen Zeitraum von 2, 4, 6, 8 und 10 Wochen, die von FM 79/84 2, 4 und 8 Wochen bei 20°C im Dunkeln gelagert. Nach Beendigung der Lagerungszeit wurden entsprechend den unterschiedlichen Behandlungsverfahren bei FM 291/83 und bei FM 78/84 je drei und bei FM 79/84 je fünf verschiedene Ansätze untersucht.

3.2.2.2.1.2. Grünmais

Dem frischen, kurz gehexelten Grünmais wurden die Trichothecene T-2 Toxin und DAS zugesetzt. Die Konzentration eines jeden Toxins betrug 1 µg/kg Mais. Die Toxine wurden in Methanol gelöst und anschließend in Aqua dest. aufgenommen, wobei die Menge des Lösungsvermittlers 2% betrug. Die wässrige Toxinlösung wurde dem Grünmais im Verhältnis 1:9 zugesetzt. Eine gute Durchmischung sorgte für eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Toxine.

Der kontaminierte Mais wurde zu achtmal 50 g und achtmal 70 g auf Erlenmeyerkolben (Fassungsvermögen 100 bzw. 200 ml) verteilt. Der Verschluß erfolgte mit Gummistopfen, welche mit Gärröhrchen versehen waren.

Restlicher, nicht mit Toxin versetzter Grünmais diente als Kontrolle. Davon wurden entsprechende Mengen abgewogen, in Erlenmeyerkolben überführt und nach Verschließen ebenfalls dem Silierungsprozeß unterzogen.

Der Silierungszeitraum betrug vier Monate; währenddessen wurde am 1. und 3. Tag, nach einer, drei und sechs Wochen, sowie nach vier Monaten jeweils ein Kolben für die spätere Mykotoxinanalyse tiefgefroren. Je ein Ansatz wurde von Versuchsbeginn bis zur dritten Woche und nach Beendigung der Silierung noch bis zum sechsten Monat täglich mit 10 ml Luft belüftet.

3.2.2.2.2. Mikrobiologische und chemische Untersuchungen

Vor der Lagerung und nach Beendigung der Lagerung zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde das toxinversetzte und toxinfreie Mischfutter auf den Gehalt an Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen untersucht. Dazu fand das von GEDEK (1974) beschriebene Oberflächenverfahren Anwendung, wobei jeweils von 10 g Probenmaterial ausgegangen wurde. Dieses wurde in steriler 10% iger Pepton-Salz-Lösung pH: 6,5, bestehend aus 10 g Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut (MERCK, Art. 7214), 5 g NaCl, 9 g Na_2HPO_4 , 1,5 g H_2PO_4 ad 1000 ml Aqua dest. suspendiert und 20 Minuten geschüttelt. Anschließend wurde im Verhältnis 1:10 eine Verdünnungsreihe bis 10^{-6} hergestellt, bei welcher ebenfalls Pepton-Salzlösung als Vorlage diente. Es wurden fünf verschiedene Nährböden zur Keimzählung und deren Differenzierung mit 0,1 ml von jeder Verdünnung beimpft. Im einzelnen handelte es sich um folgende Nährböden: Fleischextrakt-Pepton-Agar mit und ohne Zusatz von 7% sterilem, defibriniertem Hammelblut, Violett-Red-Bile-Agar (OXOID, Art. CM 107), Sabouraud-Dextrose-Agar und Czapek-Dox-Agar (OXOID, CM 97). Die Impfmenge wurde mit einem sterilen Drygalski-Spatel auf der Nährbodenoberfläche verteilt. Die Bebrütung der Platten wurde 24 Stunden bei 37°C und anschließend sechs Tage bei Zimmertemperatur vorgenommen. Die Auszählung erfolgte jeweils bei der Verdünnungsstufe, bei der die Koloniezahl zwischen 20 und 200 lag. Durch Multiplikation der Koloniezahl mit dem Verdünnungsfaktor wurde die Keimzahl pro Gramm Futtermittel ermittelt. Die Differenzierung der Bakterien erfolgte im Wesentlichen aufgrund morphologischer Kriterien des Koloniewachstums, der Mikromorphologie und der Färbbarkeit nach Gram. Für die Zuordnung der Keime zu den Hefen waren außer den morphologischen Kriterien Gär- und Assimilationseigenschaften ausschlaggebend. Die Differenzierung der Schimmelpilze erfolgte, falls

das makroskopische Bild der Kolonien keine Zuordnung gestattete, mikroskopisch anhand der Bildung und der Art ihrer Sporen im Laktophenolblau (20g Phenolblau, 20 ml Milchsäure, 40 ml Glycerin 0,05 mg Wasserblau, 20 ml Aqua dest.) gefärbten Tesafilmpräparat. Bei jeder Probe wurde unabhängig davon in der Verdünnung 1:10 das pH mit einem Indikatorstäbchen geprüft.

Anstelle der Keimgehaltsbestimmung erfolgte bei dem Grünmais zur Orientierung über die mikrobielle Tätigkeit während des Silierungsprozesses eine Überprüfung des Gesamtsäuregehaltes und der darin vorliegenden Mengen an Milch-, Essig- und Buttersäure. Zusätzlich wurde die Bildung von Ammoniak überprüft und der pH-Wert gemessen. Diese Untersuchungen wurden von der Bayerischen Landesanstalt für Tierzucht in Grub mit den hierfür üblichen Methoden (NAUMANN und BASSLER, 1976; CONWAY, 1962) vorgenommen. Die Ergebnisse wurden mir freundlicherweise für die Interpretation der Befunde der mykotoxikologischen Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

3.2.2.2.3. Mykotoxikologische Untersuchungen

3.2.2.2.3.1. Extraktion und Reinigung des Probenmaterials

Die Mykotoxinanalyse der Futtermittel erfolgte nach einer Methode, die sowohl die Erfassung der Ausgangstoxine als auch deren möglicherweise entstehenden Metaboliten sicherstellt. Zu diesem Zweck wurde das Verfahren nach ROMER et al. (1978), modifiziert nach GAREIS et al. (1985) angewendet. Es wurden zunächst 50 g Probenmaterial mit einer wässrigen Methanollösung extrahiert. Nach Präzipitation der Proteinanteile mit 30% iger Ammoniumsulfatlösung und Filtration wurden die Trichothecene mit Chloroform aus dem methanolischen Filtrat herausgelöst. Der toxinhaltige Extrakt wurde anschließend über Kieselgelsäulen weiter aufgereinigt, indem die Toxine entsprechend ihrer Polarität durch unterschiedlich polare Lösungsmittel von der Säule eluiert wurden (vgl. Abb.7).

Probenmaterial (50 g)

Extraktion mit 250 ml Methanol/Auqa dest. (1:1)
30 min schütteln, filtrieren

Filtrat (60 ml)

+ 240 ml Ammoniumsulfat (30% ig), 30 s schütteln
+ 100 mg Hyflo-Cel, 30 s schütteln, filtrieren

Filtrat (200 ml)

2x mit 10 ml Chloroform ausschütteln

Chloroformphase

filtrieren über 15 g Natriumsulfat

Chloroformfiltrat (10 ml)

+ 30 ml Hexan

Säulenchromatographie ----- Miniglassäule mit 0,5 g Natriumsulfat
2 g Kieselgel, 0,5 Natriumsulfat,
30 min äquilibrieren

Elution mit:

1. Toluol (30 ml)
2. Toluol/Aceton (40 ml; 38+2)
3. Diethylether (30 ml)-----T-2 TOXIN, DIACETOXYSCIRPENOL
4. Chloroform/Methanol (40 ml; -----HT-2 TOXIN, T-2 TRIOL, NEO-
38,5 + 1,5) SOLANOLI, MONOACETOXY-
SCIRPENOL
5. Aceton (30 ml)-----T-2 TRIOL,

Fraktion 3 und vereinigte Fraktion 4+5

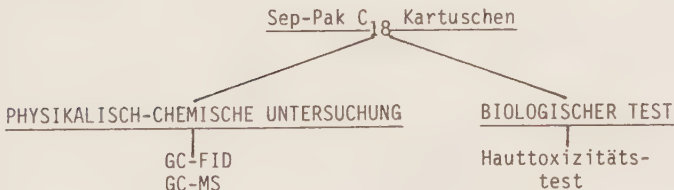


Abbildung 7: Mykotoxikologischer Untersuchungsgang für den Trichothecennachweis in den Futtermitteln

Um mit Toxinen interferierende Substanzen aus der komplexen Matrix zu entfernen, wurde ein zusätzlicher Reinigungsschritt mit Sep-Pak C₁₈-Kartuschen (ANALYTICHEN INTERNATIONAL, Art. 60 607203) durchgeführt. Hierzu wurden die Eluate (Etherfraktion= Fraktion 3 und vereinigte Chloroform/Methanol und Acetonfraktion= Fraktion 4+5) der Kieselgelsäulenchromatographie in 0,2 ml Methanol gelöst, in 1,8 ml Aqua bidest. aufgenommen und auf die mit 2 ml Methanol und mit 5 ml Aqua dest. aktivierte Kartusche aufgebracht. Zur Elution wurden 2,25 ml 80% igen Methanols verwendet. Die Eluate wurden im Rotationsverdampfer konzentriert, in Chloroform gelöst und für die weiteren Untersuchungsgänge halbiert. Eine Hälfte wurde für die gaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchung in Derivatisierungsröhrchen, die andere für den biologischen Test in kleine Schraubfläschchen überführt.

3.2.2.2.3.2. Physikalisch-chemische Nachweisverfahren

Jeweils die dritten Fraktionen wurden gaschromatographisch auf T-2 Toxin und DAS, die vereinigten Fraktionen vier und fünf auf HT-2 Toxin, T-2 Triol, Neosolaniol und MAS untersucht. Die gaschromatographische Analyse erfolgte wie bereits unter 3.2.2.1.2.2. beschrieben. Die quantitative Berechnung der Toxinmengen der Proben erfolgte durch Vergleich der Peakhöhen mit denen, der unter gleichen Bedingungen injizierten externen Toxinstandards, nach folgender Formel:

$$\text{Toxinmenge/50 g Futtermittel} = \frac{T \times P \times d \times 25 \times 2}{s \times m}$$

wobei T = injizierte Menge des Toxinstandards (µg)

P = Peakhöhe der Probe (mm)

d = Derivatisierungsvolumen der Probe (µl)

s = Peakhöhe des Toxinstandards (mm)

m = Volumen der injizierten Probe (µl)

Zur Abklärung von Interferenzen, zur Bestätigung des gaschromatographischen Ergebnisses und bei Nichtauswertbarkeit von Gaschromatogrammen (FM 78/84, Fraktionen 4+5) wurde die massenspektrometrische Untersuchung stichprobenweise durchgeführt. Diese erfolgte wie unter 3.2.2.1.2.2. beschrieben.

3.2.2.2.3.3. Biologischer Test

Die Extrakte der Etherfraktionen (Fraktion 3) und der Chloroform/Methanol- und Acetonfraktionen (vereinigte Fraktion 4+5) wurden zusätzlich mittels Hauttoxizitätstest an Meerschweinchen, einem Nachweisverfahren für Trichothecene, auf dermatotoxische Eigenschaften untersucht (WEI et al., 1972; CHUNG et al., 1974). Hierzu wurden die Extrakte der Fraktion 3 wegen der zu erwartenden Toxine mit stärkerer Hauttoxizität (vgl. Tab.2) in 200 µl, die Extrakte der Fraktion 4+5 in 100 µl Methanol gelöst. Jeweils 10 µl (= 0,1 g bzw. 0,2 g Futtermittel) der Extrakte wurden mit einer Öse auf die rasierte und enthaarte Rückenhaut von Meerschweinchen (Pirbright-white/Kisslegg, 200 - 250 g) aufgetragen. Dermatotoxische Reaktionen (Rötung, Schwellung, Nekrose) wurden nach 24 und 48 Stunden notiert.

3.3. Ergebnisse und deren Besprechung

3.3.1. Beeinflussung des Wachstums von Mikroorganismen durch T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol

Bei keinem der 45 auf ihre Empfindlichkeit gegenüber T-2 Toxin und DAS geprüften Bakterienstämme konnte eine Beeinflussung des Wachstums durch diese Toxine in den getesteten Konzentrationen festgestellt werden. Das Koloniewachstum um den toxinhaltigen Stanzlochbereich war, verglichen mit dem Koloniewachstum an den Randzonen der Agarplatten, unverändert. Auch eine Beeinflussung des Bakterienwachstums durch die 2% ige DMSO-Lösung auf den Kontrollplatten war nicht zu verzeichnen.

Der Einfluß von T-2 Toxin bzw. DAS auf das Wachstum von Algen, Hefe- und Schimmelpilzspezies in Abhängigkeit von der Toxin-konzentration und Bebrütungszeit ist aus den Tabellen 8, 9 und 10 ersichtlich. Die Beurteilung des Algen, Hefe- und Schimmelpilzwachstums gegenüber den geprüften Konzentrationen von T-2 Toxin und DAS und dessen Einstufung in sensibel, mäßig sensibel und resistent erfolgte am ersten Tag, an welchem ein eindeutiges Pilzwachstum zu verzeichnen war und ist Tabelle 8 zu entnehmen. Tabelle 9 und 10 geben den jeweiligen Hemmhofradius, verursacht von 100 µg T-2 Toxin oder DAS/Agarplatte an. Aufgrund von totaler Wachstumshemmung und gleichzeitigem Auftreten von veränderten Kolonien im Hemmhofbereich erfolgte eine Unterteilung in eine Zone der Sensibilität und in einen Bereich der mäßigen Empfindlichkeit. Eine Beeinflussung des Pilzwachstums durch die 2% ige DMSO-Lösung auf den Kontrollplatten war nicht festzustellen.

Mit Ausnahme von *Candida albicans* und *Fusarium acuminatum* waren alle getesteten Pilze und Algen gegenüber Konzentrationen von

Tabelle 8: Beeinflussung des Wachstums von Algen, Hefe- und Schimmelpilzen auf Sabouraud-Dextrose Agar
durch T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol

Gattungs- bzw. Art- zugehörigkeit	T-2 Toxinmenge in µg/Loch							DAS-Menge in µg/Loch						
	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56
Brettanomyces lambica	S	S	(S)	(S)	(S)	R	R	S	S	(S)	(S)	(S)	R	R
Prototheca sp. (Stamm 1)	S	S	(S)	(S)	(S)	R	R	(S)	(S)	R	R	R	R	R
Prototheca sp. (Stamm 2)	S	S	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	R	R	R	R
Rhodotorula sp.	S	S	(S)	R	R	R	R	(S)	(S)	(S)	R	R	R	R
Candida krusei	(S)	(S)	R	R	R	R	R	(S)	(S)	(S)	R	R	R	R
Candida albicans	R	R	R	R	R	R	R	(S)	(S)	(S)	R	R	R	R
Candida pseudotropicalis	S	S	S	S	(S)	(S)	(S)	S	S	(S)	(S)	(S)	(S)	R
Endomyces lactis	S	(S)	(S)	R	R	R	R	S	S	(S)	(S)	R	R	R
Aspergillus flavus	S	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	R	R	R	R	R	R	R
Aspergillus niger	S	(S)	(S)	(S)	(S)	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Penicillium sp.	(S)	(S)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Eurotium sp.	S	S	S	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	R	R	R
Fusarium acuminatum	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

S = Sensibilität ; (S) = mäßige Sensibilität ; R = Resistenz

Tabelle 9: Bewertung der Empfindlichkeit von Algen und hefeartigen Pilzen gegenüber T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol aufgrund der Hemizonendurchmesser des Wachstums (mm) während mehr-
tägiger Bebrütungszeit

Gattungs- bzw. Art- zugehörigkeit	T-2 Toxin (100 µg/Loch)										Diacetoxyscirpenol (100 µg/Loch)									
	Bebrütungszeit					Bebrütungszeit					Bebrütungszeit					Bebrütungszeit				
	1d	2d	3d	4d	5d	1d	2d	3d	4d	5d	1d	2d	3d	4d	5d	1d	2d	3d	4d	5d
	S (S)	S (S)	S (S)	S (S)	S (S)	S (S)	S (S)	S (S)	S (S)	S (S)	S (S)	S (S)	S (S)	S (S)	S (S)	S (S)	S (S)	S (S)	S (S)	S (S)
<i>Brettanomyces lambica</i>	11	4	7	4	0	6	0	6	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Prototheca</i> sp. (Stamm 1)	-	-	-	-	16	0	8	8	0	16	0	16	0	16	0	16	0	16	0	16
<i>Prototheca</i> sp. (Stamm 2)	12	4	11	5	11	5	6	10	0	16	0	16	0	16	0	15	0	15	0	12
<i>Rhodotorula</i> sp.	-	-	11	2	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	4	0
<i>Candida krusei</i>	0	6	0	4	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	7	0	5
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	8	0	0	0
<i>Candida pseudotropicalis</i>	15	5	11	4	5	9	0	11	0	11	0	14	2	0	12	0	12	0	7	0
<i>Endomyces lactis</i>	6	0	0	5	0	5	0	5	0	5	0	6	0	0	5	0	5	0	5	0

- = Wachstum nicht zu beurteilen S = sensibel
(S) = mäßig sensibel 0 = kein Hemmstoff

Tabelle 10: Bewertung der Empfindlichkeit von Schimmelpilzen gegenüber T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol aufgrund der Hemmzonen Durchmesser des Wachstums (mm) während mehr-tägiger Bebrütungszeit

Gattungs- bzw. Art-zugehörigkeit	T-2 Toxin (100 µg/Loch)						Diacetoxyscirpenol (100 µg/Loch)					
	1d			2d			3d			7d		
	S	(S)		S	(S)		S	(S)		S	(S)	
Aspergillus flavus	5	0		5	0		0	5		0	5	
Aspergillus niger	8	0		0	6		0	6		0	6	
Penicillium sp.	-	-		0	18		0	17		0	0	
Eurotium sp.	-	-		17	0		14	3		9	6	
Fusarium acuminatum	0	0		0	0		0	0		0	0	

- = Wachstum nicht zu beurteilen S = sensibel
(S) = mäßig sensibel 0 = kein Hemmhof

mehr als 25 µg T-2 Toxin/Agarplatte sensibel oder mäßig sensibel (Tab.8). Das Wachstum der beiden genannten Pilzarten wurde sogar von 100 µg T-2 Toxin/Agarplatte nicht beeinflusst. *Brettanomyces lam-bica*, *Rhodotorula* spezie, *Candida krusei* und *Penicillium* spezie zeigten sich anfangs gegenüber 100 µg T-2 Toxin/Agarplatte sensibel oder mäßig sensibel. Die Kolonien regenerierten sich im Laufe des Versuchs jedoch, sodaß bei Versuchsende das Wachstum im Toxinbereich verglichen mit dem in den Randzonen der Agarplatten unverändert war. Die Kolonien von allen anderen Pilzen und den beiden Algenstämmen zeigten noch bei Versuchsende deutliche, durch T-2 Toxin verursachte Schädigungen (Tab.9 und 10).

Von den geprüften Schimmelpilzspezie wurde nur das Wachstum von *Eurotium* durch DAS beeinflusst (Tab.8 und 10). Alle Hefepilzspezie und die beiden *Prototheca*stämmen erwiesen sich gegenüber Konzentrationen von mehr als 25 µg DAS/Agarplatte als sensibel oder mäßig sensibel (Tab.8). Nach Kontamination der Agarplatten mit 100 µg DAS und neuntägiger Versuchsdauer zeigten jedoch nur noch drei Hefespezie koloniemorphologische Veränderungen.(Tab.9)

Der wachstumshemmende Effekt von T-2 Toxin gegenüber chlorophyll-freien Algen, Hefe- und Schimmelpilzen war stärker als der von DAS. Schimmelpilze waren weniger empfindlich als Hefepilze und Algen. Unter den Hefen wiederum erwies sich *Candida pseudo-tropicalis* als besonders sensibel (Tab.8 und 10).

3.3.2. Transformation von T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol

3.3.2.1. In Standard-I-Bouillon mit Bakterien

Bei allen Versuchsansätzen handelte es sich über den gesamten Versuchszeitraum um Reinkulturen. Alle Toxin- und Mediumkontrollen waren keimfrei.

Die Ergebnisse der DC-Analyse der keimhaltigen Bouillonextrakte, einschließlich der semiquantitativen Bestimmung der Toxinkonzentrationen und der pH-Werte zum jeweiligen Zeitpunkt der Bouillonentnahme, enthalten die Tabellen 11, 12 und 13. Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen der Versuchsansätze mit den Stämmen der vier *Bacillus* Spezies zeigten eine Transformation von T-2 Toxin zu HT-2 Toxin und T-2 Triol und von DAS zu MAS und SCT. T-2 Toxin und DAS konnten in den Kulturen mit *Bacillus megaterium* ab dem 3. Bebrütungstag nicht mehr nachgewiesen werden. Die gaschromatographische Untersuchung zeigte jedoch, daß T-2 Toxin erst am 17. Bebrütungstag völlig verschwunden und DAS immer noch in Spuren vorhanden war. Mit *Bacillus subtilis* var. *mycoides* und *Bacillus subtilis* im Medium wurde T-2 Toxin dünnschichtchromatographisch am 14. bzw. 17. Tag noch in Spuren gefunden, während DAS in den *Bacillus subtilis* var. *mycoides* und in den *Bacillus cereus*-Kulturen auch am Versuchsende deutlich zu detektieren war. HT-2 Toxin war teilweise bereits am 3. Tag eindeutig nachweisbar. Auch MAS konnte zu diesem Zeitpunkt in der Kultur mit dem *Bacillus megaterium*-Stamm in einer Konzentration von 140 µg/20 ml Probenaliquot gefunden werden. Geringe Mengen von T-2 Triol und SCT zeigten sich ab dem 7. bzw. 10. Bebrütungstag mit *Bacillus subtilis* var. *mycoides* und dem 10. bzw. 17. Bebrütungstag mit *Bacillus megaterium* im Medium auf der DC-Platte (Tab.11). Eine Überprüfung mittels GC-MS zeigte, daß ein Extrakt der Kultur

Tabelle 11: Ergebnisse der Versuche mit grampositiven Stäbchenbakterien in Standard-I-Bouillon unter Berücksichtigung des pH-Wertes der Bouillonkultur und der Bebrütungszeit

Bakterium	Analysen- verfahren	Bebrütungs- zeit (Tage)	Toxingehalt in µg/Kulturextrakt (20 ml)					pH- Wert	SCT
			T-2 Toxin	HT-2 Toxin	T-2 Triol	T-2 Tetraol	DAS		
Bacillus megaterium (Stamm 214)	DC	3	40	160	∅	∅	7,6	140	∅
		7	∅	160	∅	∅	8,9	160	∅
		10	∅	160	20	∅	8,9	160	∅
		14	∅	160	40	∅	8,9	160	∅
		17	∅	120	40	∅	9,2	180	20
		21	∅	120	80	∅	9,2	180	20
	GC	3	+	+	∅	∅	7,6	+	∅
		7	+	+	∅	∅	8,9	+	+
		10	+	+	+	∅	8,9	+	+
		14	+	+	+	∅	8,9	+	+
		17	∅	+	+	∅	9,2	+	+
		21	∅	+	+	∅	9,2	+	+
	GC-MS	14	∅	+	-	-	8,9	-	-
		21	∅	+	+	∅	9,2	∅	+
Bacillus subtilis (Stamm 176)	DC	3	+	+	∅	∅	-	-	-
		17	+	+	+	∅	-	-	-
	GC-MS	17	-	+	+	∅	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 11

Bakterium	Analysen- verfahren	Bebrütungs- zeit (Tage)	Toxingehalt in µg/Kulturextrakt (20 ml)				pH- Wert	DAS	MAS	SCT
			T-2 Toxin	HT-2 Toxin	T-2 Triol	T-2 Tetraol				
<i>Bacillus subtilis</i> <i>var. mycoides</i> (Stamm 210)	DC	3	80	20	ø	ø	7,6	160	ø	ø
		7	40	80	40	ø	9,2	160	20	ø
		10	+	100	80	ø	9,2	120	80	20
		14	+	100	80	ø	9,2	80	100	20
	GC-MS	14	-	+	+	+	9,2	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> (Stamm 186)	DC	3	200	ø	ø	ø	7,0	200	ø	ø
		7	180	20	ø	ø	7,4	200	ø	ø
		10	120	40	+	ø	8,4	160	ø	ø
		14	100	60	20	ø	8,9	80	120	ø
		17	80	80	30	ø	8,9	40	120	+
		21	60	120	40	ø	9,2	20	140	20
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (Stamm 2)	DC	3	200	ø	ø	ø	4,5	200	ø	ø
		7	200	ø	ø	ø	4,5	200	ø	ø
		10	200	ø	ø	ø	4,6	200	ø	ø
		14	200	ø	ø	ø	4,6	200	ø	ø
	GC	14	-	+	ø	ø	4,6	+	ø	ø

ø = negativ; - = nicht untersucht; + = in Spuren nachweisbar; + = positiv

mit *Bacillus subtilis* var. *mycoides* zusätzlich geringe Mengen an T-2 Tetraol und Neosolaniol enthielt, während dies in dem Extrakt mit dem *Bacillus megaterium*-Stamm nicht der Fall war (Tab.11).

Abbildung 8 gibt die massenspektrometrische Detektion von HT-2 Toxin in der mit T-2 Toxin versetzten Standard-I-Bouillon nach vierzehntägiger Bebrütungszeit mit *Bacillus megaterium* wieder. Aus den Massenchromatogrammen zweier charakteristischer Ionen für HT-2 Toxin (m/e 455 und 617) ist ersichtlich, daß das Toxin in dem Extrakt zur entsprechenden Retentionszeit wie HT-2 Standardtoxin nachgewiesen wurde (Abb.9).

In den Kulturen mit *Lactobacillus acidophilus* Stamm 2, *Streptococcus faecium* Stamm 68, *Streptococcus faecium* Stamm M 74 und *Streptococcus faecium* subsp. *durans* Stamm 1 konnte dünn-schicht-chromatographisch kein Abbau von T-2 Toxin oder DAS festgestellt werden. Allerdings wurde bei der gaschromatographischen Analyse in den Kulturextrakten mit allen vier Keimen HT-2 Toxin und bei der massenspektrometrischen Analyse eines Kulturextraktes von *Streptococcus faecium* Stamm 68 auch MAS in geringer Konzentration gefunden (Tab.11+12).

Die Kulturextrakte der Stämme der zwei getesteten Staphylokokken-Arten, von *Erwinia* Stamm 218/1 und *Erwinia* Stamm 176, von *Enterobacter agglomerans* und *Pseudomonas fluorescens*, zeigten einen Abbau von T-2 Toxin zu HT-2 Toxin und T-2 Triol und von DAS zu MAS. T-2 Triol entstand teilweise nur in geringen Mengen (Tab. 12 und 13). In Kulturextrakten von *Staphylococcus sciuri* wurde zusätzlich SCT detektiert.

In einem Kulturextrakt mit *Erwinia* sp. Stamm 176 wurde bei der massenspektrometrischen Untersuchung Neosolaniol gefunden.

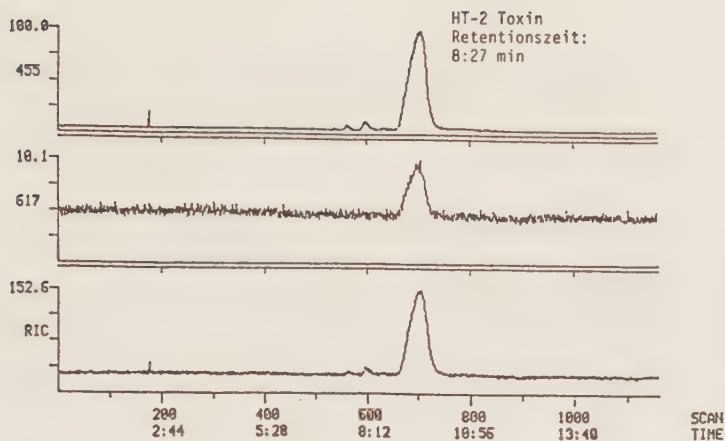


Abbildung 8: Massenchromatogramme (m/e 455 und 617) und Totalionenstrom (RIC) des HT-2 Toxin-positiven Extraktes von *Bacillus megaterium* (MBTFA-Derivatisation) nach 14-tägiger Bebrütungszeit in mit T-2 Toxin kontaminierter Standard-I-Bouillon

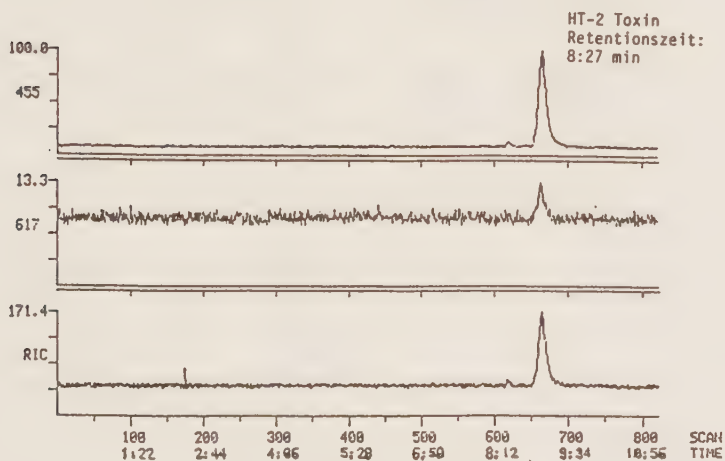


Abbildung 9: Massenchromatogramme (m/e 455 und 617) und Totalionenstrom (RIC) von HT-2 Toxinstandard (MBTFA-Derivatisation) bei positiv chemischer Ionisation in Methan.

Tabelle 12: Ergebnisse der Versuche mit grampositiven Kokken in Standard-I-Bouillon unter Berücksichtigung des pH-Wertes der Bouillonkultur und der Bebrütungszeit

Bakterium	Analysen- verfahren	Bebrütungs- zeit (Tage)	Toxingehalt in µg/Kulturextrakt (20 ml)					pH- Wert	DAS	MAS	SCT
			pH- Wert	T-2 Toxin	HT-2 Toxin	T-2 Triol	T-2 Tetraol				
Strepto- coccus faecium (Stamm 68)	DC	3	7,2	200	ø	ø	ø	7,0	200	ø	ø
		7	5,9	200	ø	ø	ø	5,7	200	ø	ø
		10	5,9	200	ø	ø	ø	5,9	200	ø	ø
		14	5,9	200	ø	ø	ø	5,9	200	ø	ø
	GC	3	7,2	+	ø	ø	ø	7,0	+	ø	ø
		7	5,9	+	+	ø	ø	5,7	+	ø	ø
		10	5,9	+	+	ø	ø	5,9	+	ø	ø
		14	5,9	+	+	ø	ø	5,9	+	ø	ø
GC-MS	14	5,9	-	-	-	-	5,9	+	+	-	
Strepto- coccus faecium (Stamm M 74)	DC	3	5,9	200	ø	ø	ø	5,8	200	ø	ø
		7	5,9	200	ø	ø	ø	5,9	200	ø	ø
		10	5,9	200	ø	ø	ø	5,9	200	ø	ø
		14	5,9	200	ø	ø	ø	5,9	200	ø	ø
	GC	3	5,9	+	+	ø	ø	5,9	+	ø	ø
		7	5,9	+	+	ø	ø	5,9	+	ø	ø
		10	5,9	+	+	ø	ø	5,9	+	ø	ø
		14	5,9	+	ø	ø	ø	5,9	+	ø	ø

Fortsetzung Tab.12

Bakterium	Analysen- verfahren	Bebrütungs- zeit (Tage)	Toxingehalt in µg/Kulturextrakt (20 ml)				pH- Wert	DAS	MAS	SCT
			T-2 Toxin	HT-2 Toxin	T-2 Triol	T-2 Tetraol				
Strepto- coccus	DC	3	200	∅	∅	∅	5,3	200	∅	∅
		7	200	∅	∅	∅	5,3	200	∅	∅
		10	200	∅	∅	∅	5,3	200	∅	∅
		14	200	∅	∅	∅	5,5	200	∅	∅
		17	200	∅	∅	∅	5,5	200	∅	∅
faecium subsp. durans (Stamm 1)	GC	3	+	+	∅	∅	5,3	+	∅	∅
		7	+	+	∅	∅	5,3	+	∅	∅
		10	+	+	∅	∅	5,3	+	∅	∅
		14	+	+	∅	∅	5,5	+	∅	∅
		17	+	+	∅	∅	5,5	+	∅	∅
Staphylo- coccus sciuri (Stamm 249)	DC	3	120	∅	∅	∅	8,6	180	+	∅
		7	120	40	∅	∅	8,9	120	40	∅
		10	100	80	20	∅	9,2	100	80	+
		14	80	80	40	∅	9,2	80	80	+
Staphylo- coccus xylosus (Stamm 210)	DC	3	160	20	∅	∅	8,6	120	+	∅
		7	120	40	+	∅	8,9	120	+	∅
		10	80	100	20	∅	9,0	100	40	∅
		14	60	100	40	∅	9,2	100	40	∅

∅ = negativ; - = nicht untersucht; + = in Spuren nachweisbar; + = positiv

Fortsetzung Tab.13

Bakterium	Analysen- verfahren	Bebrütungs- zeit (Tage)	pH- Wert	Toxingehalt in µg/Kulturextrakt (20 ml)				pH- Wert	DAS	MAS	SCT
				T-2 Toxin	HT-2 Toxin	T-2 Triol	T-2 Tetraol				
Enterobacter agglomerans (Stamm 186)	DC	3	8,9	120	20	∅	∅	8,6	120	20	∅
		7	8,9	100	40	20	∅	8,9	120	20	∅
		10	9,0	80	60	40	∅	9,0	100	30	∅
		14	9,0	60	60	40	∅	9,2	100	30	∅
Erwinia (Stamm 220)	DC	3	8,6	160	∅	∅	∅	8,6	140	40	∅
		7	8,9	80	60	+	∅	8,9	120	60	+
		10	9,2	60	60	+	∅	9,2	100	80	+
		14	9,2	40	80	40	∅	9,2	80	120	+
Erwinia (Stamm 218/1)	DC	3	8,3	120	∅	∅	∅	8,0	140	∅	∅
		7	8,8	80	20	∅	∅	8,8	120	40	∅
		10	9,2	40	40	∅	∅	9,2	100	60	∅
		14	9,2	40	40	20	∅	9,2	80	80	∅
Erwinia (Stamm 218/2)	DC	3	7,3	200	∅	∅	∅	7,3	200	∅	∅
		7	7,9	200	20	∅	∅	7,9	200	∅	∅
		10	8,3	180	20	∅	∅	8,5	200	20	∅
		14	8,8	160	40	+	∅	9,2	160	40	∅
		17	9,2	100	60	+	∅	9,2	120	60	∅
		21	9,2	80	80	20	∅	9,2	80	80	+

Fortsetzung Tab.13

Bakterium	Analysen- verfahren	Bebrütungs- zeit (Tage)	Toxingehalt in µg/Kulturextrakt (20 ml)						MAS	SCT
			pH- Wert	T-2 Toxin	HT-2 Toxin	T-2 Triol	T-2 Tetraol	pH- Wert	DAS	
Erwinia (Stamm 176)	DC	3	8,7	120	∅	∅	∅	8,3	140	∅
		7	8,9	80	30	∅	∅	8,9	120	20
		10	9,2	60	40	∅	∅	8,9	120	40
		14	9,2	40	80	20	∅	9,2	100	80
Pseudomonas fluorescens (Stamm 292)	DC	3	8,1	160	∅	∅	∅	8,1	160	∅
		7	8,8	120	40	∅	∅	8,9	120	80
		10	8,9	80	60	20	∅	8,9	100	110
		14	9,2	40	70	30	∅	9,2	80	100

∅ = negativ; - = nicht untersucht; + = in Spuren nachweisbar; + = positiv

Die massenspektrometrische Untersuchung einer mit T-2 Toxin versetzten Bouillonkultur von *Citrobacter freundii* bestätigte das dünnstschichtchromatographische Ergebnis. Es wurden jedoch noch zusätzlich geringe Mengen an T-2 Tetraol detektiert.

Die vergleichsweise unterschiedlichen Fähigkeiten der Bakterien zur Transformation von T-2 Toxin und DAS während einer 14- bzw. 21-tägigen Versuchsdauer geben die Abbildungen 10 - 13 wieder. Der *Bacillus megaterium*-Stamm (Abb.10 und 12) erwies sich beim Abbau dieser Toxine als weitaus aktiver als der Stamm von *Staphylococcus sciuri* (Abb. 11 und 13). Mit *Bacillus megaterium* im Medium war die zugesetzte T-2 Toxinmenge bereits am dritten Bebrütungstag zu 80% reduziert und am siebten Tag völlig verschwunden (Abb.10). In der Kultur mit *Staphylococcus sciuri* dagegen betrug die T-2 Toxinkonzentration noch am siebten Bebrütungstag 60% des Anfangswertes und war bis zum Abbruch des Versuches am 14. Tag nur um weitere 20% verringert (Abb.11). Deutliche Unterschiede zwischen den Stämmen der beiden Keimarten zeigten sich auch in der Bildung von HT-2 Toxin. In dem Medium mit *Bacillus megaterium* wurden bereits am 3. Bebrütungstag 160 µg HT-2 Toxin/20 ml Medium gemessen. Diese Menge blieb über einen Zeitraum von elf Tagen konstant und fiel gegen Versuchsende auf 120 µg/20 ml Medium ab (Abb.10). HT-2 Toxin konnte in dem Medium mit *Staphylococcus sciuri* erst ab dem siebten Tag detektiert werden. Auch entstand HT-2 Toxin in weitaus geringerer Menge als in der Kultur mit *Bacillus megaterium* (Abb.11). Bei den Versuchen mit DAS zeigten die Kurven der nachgewiesenen Toxinkonzentrationen ähnlichen Verlauf (Abb.12 und 13).

Wie aus den Tabelle 11 - 13 und den Abbildungen 10 - 13 ersichtlich ist, erfolgte die Transformation von T-2 Toxin zu HT-2 Toxin und T-2 Triol und von DAS zu MAS und SCT hauptsächlich dann, wenn durch

ABB.10:

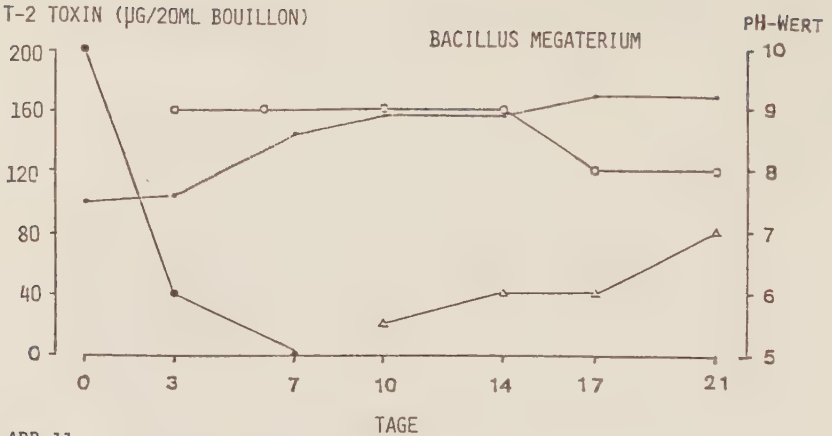
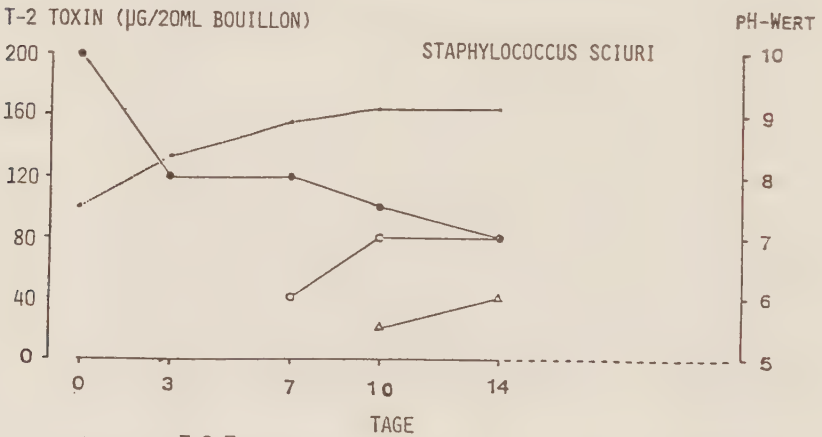


ABB.11:



- = T-2 TOXIN
- = HT-2 TOXIN
- △—△ = T-2 TRIOL
- = PH-WERT

ABB.10 UND 11: TRANSFORMATION VON T-2 TOXIN ZU HT-2 TOXIN UND T-2 TRIOL DURCH BACILLUS MEGATERIUM (ABB.10) UND STAPHYLOCOCCUS SCIURI (ABB.11) WÄHREND 21- BZW. 14-TÄGIGER BEBROTUNGSZEIT IN STANDARD-I-BOUILLON.

ABB.12:

DAS ($\mu\text{G}/20\text{ML BOUILLON}$)

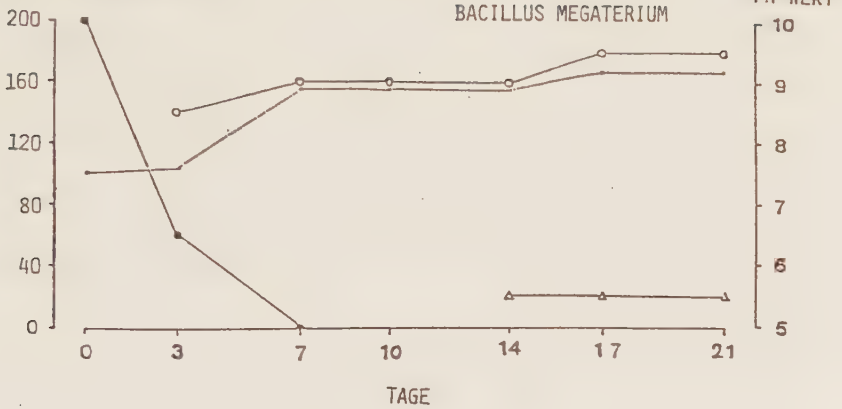


ABB.13:

DAS ($\mu\text{G}/20\text{ML BOUILLON}$)

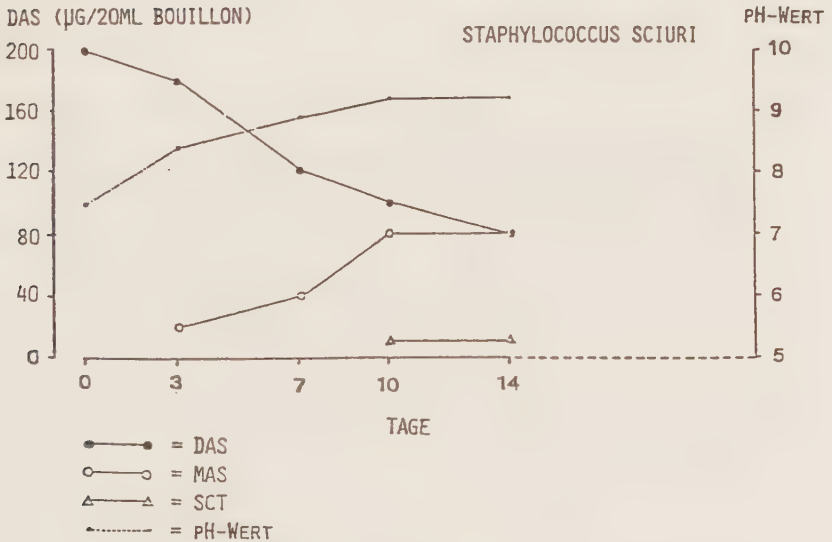


ABB.12 UND 13: TRANSFORMATION VON DIACETOXYSCIRPENOL ZU MONOACETOXYSCIRPENOL UND SCIRPENTRIOL DURCH BACILLUS MEGATERIUM (ABB.12) UND STAPHYLOCOCCUS SCIURI (ABB.13) WÄHREND 21- BZW. 14-TÄGIGER BEBRÜTUNGSZEIT IN STANDARD-I-BOUILLON.

das Bakterienwachstum eine Verschiebung des anfänglich in der Nähe des Neutralpunktes liegenden pH-Wertes in den alkalischen Bereich zu verzeichnen war. In den Bouillonkulturen mit *Bacillus megaterium* waren T-2 Toxin und DAS bereits am dritten Bebrütungstag größtenteils in HT-2 Toxin bzw. MAS transformiert worden, obwohl der pH-Wert der Kulturen zu diesem Zeitpunkt noch bei 7,6 lag (Tab.11 und Abb.10 und 12). Auch in einem Extrakt der Kultur mit *Bacillus subtilis* var. *mycoides* konnte bei einem pH-Wert von 7,4 nach 3-tägiger Bebrütungszeit bereits HT-2 Toxin detektiert werden (Tab.11).

Ein Abbau von T-2 Toxin und DAS zu HT-2 Toxin bzw. MAS fand teilweise auch in einem pH-Bereich zwischen 4,6 und 5,9 statt. Dieser war jedoch so gering, daß er dünnschichtchromatographisch, nicht jedoch gaschromatographisch festgestellt werden konnte (Tab.12).

3.3.2.2. In keimfreier Standard-I-Bouillon

Im keimfreien, mit Toxin versetzten Medium mit pH 7,5 konnte nach einer 14-tägigen Bebrütungszeit bei der Untersuchung von 0,5 ml Probenaliquot dünnschichtchromatographisch kein Abbau festgestellt werden. Wurde jedoch die fünffache Menge auf die DC-Platte aufgetragen, war deutlich zu erkennen, daß HT-2 Toxin entstanden war. Auch MAS konnte in geringer Konzentration detektiert werden. Wurde die fünfzehnfache Menge untersucht, wurden zusätzlich geringe Mengen an T-2 Triol gefunden. Die Entstehung von SCT konnte jedoch mit dieser Untersuchungsmethode nicht bestätigt werden. Das pH im Medium hatte sich während der zweiwöchigen Versuchsdauer nicht verändert.

Im keimfreien, mit Toxin versetzten Medium dessen pH zu Versuchsbeginn auf 9,2 eingestellt worden war, konnte bereits nach drei Tagen Bebrütungszeit eine Hydrolyse von T-2 Toxin zu HT-2 Toxin und von DAS zu MAS bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung festgestellt werden. Nach 17-tägiger Bebrütungszeit wurden T-2 Triol und SCT in Spuren (4,0 - 12,0 µg/200 ml Probenaliquot) nachgewiesen (Tab.14, Abb.14 und 15). Aufschluß über das Ausmaß des Einflusses des alkalisierten Mediums auf die Transformation von T-2 Toxin zu HT-2 Toxin und T-2 Triol und von DAS zu MAS und SCT gibt Tabelle 14.

Tabelle 14: Einfluß von alkalisierter (pH 9,2), keimfreier Standard-I-Bouillon auf die Transformation von T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol in Abhängigkeit von der Bebrütungszeit

Bebrütungszeit (Tage)	pH-Wert	Toxinkonzentration (µg/200 ml Probenaliquot)					
		Ansatz mit T-2 Toxin			Ansatz mit DAS		
		T-2 Toxin	HT-2 Toxin	T-2 Triol	DAS	MAS	SCT
3	9,2	140	60	∅	180	40	∅
7	9,2	120	80	∅	160	60	∅
10	8,9	100	100	∅	120	80	∅
14	8,9	100	100	∅	120	80	∅
17	8,6	60	120	S	100	80	S
21	8,6	60	120	S	100	100	S

∅ = nicht nachweisbar

S = Spurenbereich (4,0 - 12,0 µg)

ABB.14:

T-2 TOXIN ($\mu\text{G}/20\text{ML BOUILLON}$)

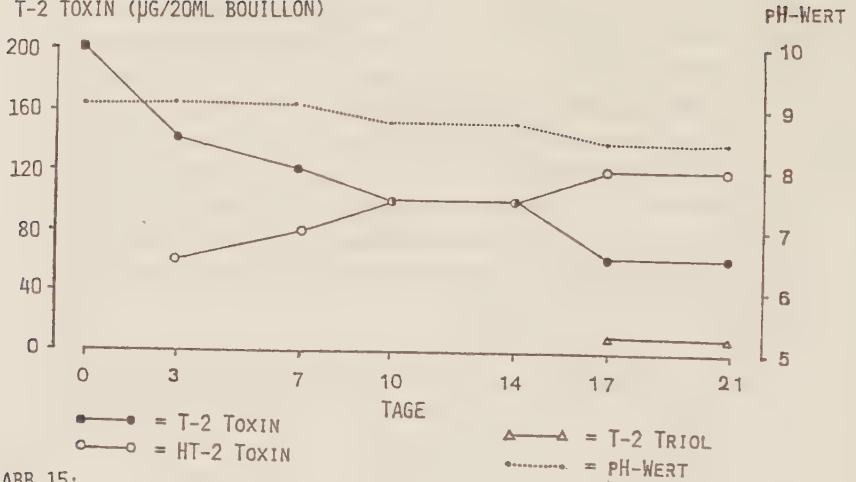


ABB.15:

DAS ($\mu\text{G}/20\text{ML BOUILLON}$)

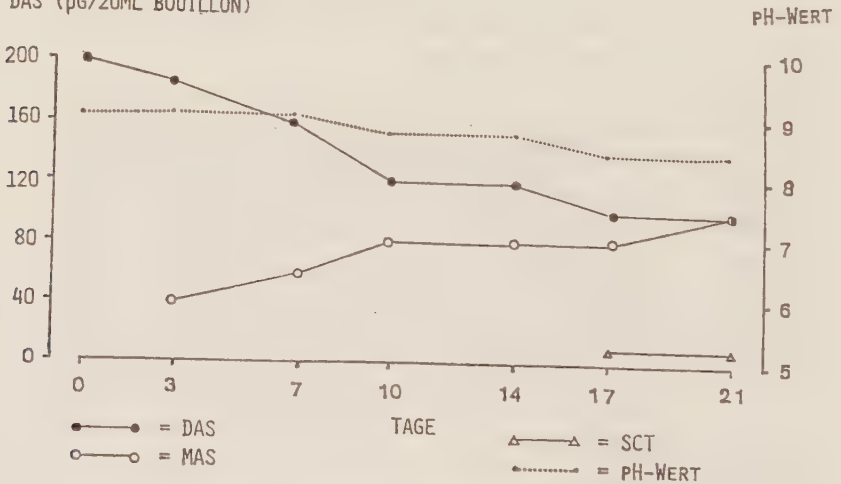


ABB.14 UND 15: EINFLUSS ALKALISierter, KEIMFREIER STANDARD-I-BOUILLON AUF DIE TRANSFORMATION VOM T-2 TOXIN ZU HT-2 TOXIN UND T-2 TRIOL (ABB.14) UND VON DIACETOXYSCIRPENOL ZU MONOACETOXYSCIRPENOL UND SCIRPEN-TRIOL (ABB.15) WÄHREND 21-TÄGIGER BEBROTUNGSZEIT.

Die Transformation von T-2 Toxin zu HT-2 Toxin und T-2 Triol und von DAS zu MAS und SCT in alkalisierter keimfreier Standard-I-Bouillon während einer dreiwöchigen Versuchsdauer ist in Abbildung 14 und 15 graphisch dargestellt. T-2 Toxin und DAS waren nach 14 bzw. 21 Tagen noch zu 50% vorhanden und somit noch eindeutig nachweisbar. HT-2 Toxin und MAS entstanden während des Versuchszeitraumes von 21 Tagen in Mengen von 120 µg bzw. 100 µg/20 ml Probenaliquot.

3.3.2.3. Im Medium nach UENO et al. (1983)

Die dünnsschichtchromatographische Untersuchung ergab mit keinem der vier getesteten Bakterienstämme einen Abbau von T-2 Toxin oder von DAS im Medium nach UENO et al. (1983). Bei der gaschromatographischen Überprüfung dieses Ergebnisses stellte sich jedoch heraus, daß im T-2 Toxinhaltigen Medium mit E. coli (Stamm 1) HT-2 Toxin entstanden war. Mengenmäßig handelte es sich allerdings nur um Spuren, so daß keine Quantifizierung erfolgen konnte. Ein bei der Gaschromatographie (GC) des keimfreien T-2 Toxinhaltigen Extraktes auftretender Peak von HT-2 Toxin erwies sich bei der massenspektrometrischen Überprüfung als negativ. Das Vorhandensein geringer Mengen an HT-2 Toxin im Extrakt des keimhaltigen Mediums konnte dagegen massenspektrometrisch bestätigt werden.

Sämtliche Untersuchungen der Extrakte, aus mit DAS versetzten Medien, mit GC-MS in Bezug auf eine Transformation von DAS in MAS und SCT waren negativ.

Das pH des Mediums lag bei Versuchsbeginn bei 6,1 und stieg im Laufe der Versuchsdauer auf Werte bis zu pH 6,5 (E. coli Stamm 1) an.

3.3.2.4. In Mischfutter

Die gaschromatographische Analyse des nicht sterilisierten Mischfuttermehls 291/83 ergab nach einer zweiwöchigen Lagerungsdauer noch 33% der T-2 Toxin- und noch 39% der DAS-Ausgangskonzentration. Die dritte Fraktion des Extraktes zeigte auch eine im Hauttoxizitätstest am Meerschweinchen noch deutlich positive Hautreaktionen in Form von Epidermisrötung und Epidermisödem. Nach weiteren zwei Wochen Lagerung hatte sich die Toxinkonzentration weiterhin verringert. Nach sechs Wochen war T-2 Toxin völlig verschwunden, DAS wurde teilweise nur noch in Spuren ($2,5 \mu\text{g}/50 \text{ g}$ Futter) gefunden (vgl. Tab.15).

Im Futtermehl mit den abgetöteten Keimen hingegen wurden T-2 Toxin und DAS während der gesamten Versuchsdauer annähernd in der Konzentration wiedergefunden, in der sie zugesetzt worden waren. Auch verursachten die dritten Fraktionen der Extrakte jeweils positive Hautreaktionen, teilweise sogar mit Auftreten von Nekrosen (vgl. Tab.15).

Im Mischfuttermehl mit dem natürlichen Keimbesatz waren bereits nach zwei Wochen Mengen von $40,3 \mu\text{g}$ HT-2 Toxin/50 g Futter, sowie auch MAS in geringer Konzentration detektierbar. Nach weiteren zwei Wochen der Lagerung wies das Futtermittel die höchsten meßbaren HT-2 Toxin- und MAS-Konzentrationen auf. Die Fraktionen vier und fünf der Extrakte waren entsprechend stark hauttoxisch. Nach sechs Wochen konnten HT-2 Toxin und MAS teilweise nur noch in Spuren detektiert werden (vgl. Tab.15). Im Mischfutter, in welchem die Keime abgetötet worden waren, konnte in keinem Fall HT-2 Toxin nachgewiesen werden.

Die Untersuchung auf weitere Transformationsprodukte wie T-2 Triol und Neosolaniol verlief ebenfalls negativ.

Tabelle 15: Ergebnisse der mykotoxikologischen und der mikrobiologischen Untersuchungen des mit T-2 Toxin und DAS versetzten Mischfutters 291/83 nach unterschiedlicher Lagerungszeit

Lagerungs- zeit (Wochen)	Hauttoxizitäts- test Frak.3 Frak.4+5		Toxingehalt µg/50 g Futter	Art und Höhe des Keim- besatzes /g Futter
Futtermittel mit lebensfähigen Keimen				
2	++	∅	16,5 T-2 Toxin 40,3 HT-2 Toxin 19,5 DAS 5,5 MAS	Bakt. : $4,8 \times 10^6$ M,E Hefen : $< 10^2$ Schi.pi.: $< 10^2$
4	+	++	8,4 T-2 Toxin 52,8 HT-2 Toxin 11,4 DAS 64,0 MAS	Bakt. : $5,2 \times 10^6$ M,E Hefen : $< 10^2$ Schi.pi.: $< 10^2$
6	∅	∅	∅ T-2 Toxin ∅ HT-2 Toxin ∅ DAS ∅ MAS	Bakt. : $8,0 \times 10^8$ M,E,G,P Hefen : $5,0 \times 10^8$ Schi.pi.: $5,0 \times 10^8$ Pe,Af,Ac,Mu
8	(+)	∅	∅ T-2 Toxin ∅ HT-2 Toxin 2,5 DAS 8,7 MAS	Bakt. : $2,0 \times 10^9$ M,G Hefen : $1,8 \times 10^8$ T Schi.pi.: $< 10^2$
10	∅	∅	∅ T-2 Toxin ∅ HT-2 Toxin ∅ DAS ∅ MAS	Bakt. : $1,9 \times 10^8$ M,G,B Hefen : $< 10^2$ Schi.pi.: $< 10^2$
Futtermittel mit abgetöteten Keimen				
2	++	∅	28,5 T-2 Toxin ∅ HT-2 Toxin 68,3 DAS ∅ MAS	
4	++	∅	31,0 T-2 Toxin ∅ HT-2 Toxin 59,2 DAS ∅ MAS	
6	++	∅	43,6 T-2 Toxin ∅ HT-2 Toxin 47,3 DAS ∅ MAS	
8	+++	+	28,7 T-2 Toxin ∅ HT-2 Toxin 51,6 DAS ∅ MAS	
10	++	∅	39,0 T-2 Toxin ∅ HT-2 Toxin 29,9 DAS ∅ MAS	

Zeichenerklärung zur Tabelle 15:

- ∅ = negativ
- (+) = schwache Epidermisrötung
- +
- ++ = Epidermisrötung
- ++ = Epidermisödem
- +++ = Epidermisnekrose
- B = Bacillusarten
- M = Micrococcaceae bzw. Haufenkokken, saprophytär
- G = gelb pigmentierte, gramnegative Stäbchenbakterien der Gattung *Erwinia* aus der Familie der Enterobacteriaceae
- E = Enterobacteriaceae (KES-Gruppe, *Citrobacter* u.a., ausgenommen Gattung *Erwinia* (s.o.) sowie *Proteus*keime und *Salmonellen*)
- P = Pseudomonasarten und andere nicht pigmentierte, gramnegative, stäbchenförmige Proteolyten wie *Alcaligenes faecalis* oder Proteusbakterien
- T = Trichosporonarten
- Pe = *Penicillium*-Arten
- Af = *Aspergillus flavus*
- Ac = *Aspergillus candidus*-Gruppe
- Mu = Mucoraceae
- $< 10^2$ = unterhalb der Nachweisgrenze quantitativer Oberflächenverfahren

Die mikrobiologischen Untersuchungen von FM 291/83 mit und ohne Toxinzusatz zeigten keine Unterschiede. Art und Höhe des Keimbesatzes waren identisch. Die Ergebnisse der Untersuchungen des mit Toxin versetzten Futters können der Tabelle 15 entnommen werden. Ein nachträglicher Zusatz von 10 ml sterilem Aqua bidest. je Versuchsansatz in der vierten Lagerungswoche hatte in der sechsten Woche eine Steigerung des Keimwachstums, insbesondere der gramnegativen Stäbchenbakterien und der Pilze zur Folge. Der durch die Erhöhung des Feuchtigkeitsgehaltes verstärkt einsetzende Verderb des Futtermittels wirkte sich jedoch letztendlich teilweise negativ auf das Wachstum dieser Mikroorganismen aus, sodaß bei Versuchsende der Anteil der gramnegativen Stäbchenbakterien deutlich verringert war, und Pilze sogar nicht mehr nachgewiesen werden konnten (vgl. Tab.15).

Die mykotoxikologische Untersuchung des Mischfutters 78/84 zeigte, daß nach einer Lagerungszeit von zwei Wochen die Ausgangskonzentration von 1mg T-2 Toxin und 1mg DAS/kg nicht sterilisierten Futters noch vollständig vorhanden war. Ab der vierten Lagerungswoche war DAS jedoch nicht mehr, und T-2 Toxin teilweise nur noch in Spuren detektierbar (vgl. Tab.16).

Der Hauttoxizitätstest mit der dritten Fraktion der Extrakte lieferte einheitlich ein negatives Ergebnis, wohingegen fast alle Tests mit der dritten Fraktion des Futters mit abgetöteter Mikroflora eine positive Hautreaktion ergaben (Tab.16). Die Chromatogramme der GC-Analyse der Fraktionen vier und fünf der Extrakte des nicht hitzesterilisierten Futters waren wegen Auftretens starker Interferenzen nicht auswertbar. Interferenzen ergaben sich vor allem im Bereich der Retentionszeiten der Transformationsprodukte HT-2 Toxin und MAS. Eine Überprüfung der Fraktionen zweier Extrakte auf ihren Gehalt an HT-2 Toxin mittels GC-MS führte zu dem

Tabelle 16: Ergebnisse der mykotoxikologischen und der mikrobiologischen Untersuchungen des mit T-2 Toxin und DAS versetzten Mischfutters 78/84 nach unterschiedlicher Lagerungszeit

Lagerungs- zeit (Wochen)	pH- Wert	Hauttoxizitäts- test Frak.3 Frak.4+5		Toxingehalt µg/50 g Futter	Art und Höhe des Keimbe- satzes/g Futter
Futtermittel mit lebensfähigen Keimen					
0	-	-	-	ø T-2 Toxin ø DAS	Bakt. : $1,6 \times 10^5$ E,G,M,B Hefen : $1,0 \times 10^3$ T Schi.pi. : $1,2 \times 10^4$ Af, Ac
2	6,7	ø	+	61,7 T-2 Toxin 44,2 DAS	Bakt. : $2,0 \times 10^9$ E,G,M,P Hefen : $2,4 \times 10^7$ T Schi.pi. : $4,0 \times 10^6$ Pe, Af
4	8,8	ø	ø	ø T-2 Toxin ø DAS	Bakt. : $2,8 \times 10^9$ M,B Hefen : $< 10^2$ Schi.pi. : $< 10^2$
6	8,8	ø	ø	2,7 T-2 Toxin ø DAS	Bakt. : $5,5 \times 10^6$ M,B,P Hefen : $< 10^2$ Schi.pi. : $< 10^2$
8	9,0	ø	ø	ø T-2 Toxin ø DAS	Bakt. : $1,8 \times 10^6$ M,B,P Hefen : $< 10^2$ Schi.pi. : $< 10^2$
10	8,8	ø	ø	ø T-2 Toxin ø DAS	Bakt. : $8,0 \times 10^6$ M,B,P Hefen : $< 10^2$ Schi.pi. : $< 10^2$
Futtermittel mit abgetöteten Keimen					
2	5,8	+	ø	55,4 T-2 Toxin ø HT-2 Toxin 56,0 DAS ø MAS	
4	5,9	+	ø	53,6 T-2 Toxin ø HT-2 Toxin 59,0 DAS ø MAS	
6	7,0	+	ø	50,9 T-2 Toxin ø HT-2 Toxin 63,0 DAS ø MAS	
8	7,2	+	ø	51,8 T-2 Toxin ø HT-2 Toxin 66,0 DAS ø MAS	
10	7,0	ø	ø	48,2 T-2 Toxin ø HT-2 Toxin x DAS ø MAS	

Zeichenerklärung zur Tabelle 16:

- ∅ = negativ
- +
- = nicht untersucht
- * = wegen Interferenzen nicht auswertbar
- B = Bacillusarten
- M = Micrococcaceae bzw. Haufenkokken, saprophytär
- G = gelb pigmentierte, gramnegative Stäbchenbakterien der Gattung *Erwinia* aus der Familie der Enterobacteriaceae
- E = Enterobacteriaceae (KES-Gruppe, *Citrobacter* u.a., ausgenommen Gattung *Erwinia* (s.o.) sowie Proteuskeime und Salmonellen)
- P = Pseudomonasarten und andere nicht pigmentierte, gramnegative, stäbchenförmige Proteolyten wie *Alcaligenes faecalis* oder Proteusbakterien
- T = Trichosporonarten
- Pe = *Penicillium*-Arten
- Af = *Aspergillus flavus*
- Ac = *Aspergillus candidus*-Gruppe
- 10^2 = unterhalb der Nachweisgrenze quantitativer Oberflächenverfahren

Ergebnis, daß sowohl nach zwei als auch nach vier Wochen Lagerung HT-2 Toxin vorhanden war. Die gaschromatographische und massenspektrometrische Überprüfung von Probenmaterial des sterilisierten Futters auf HT-2 Toxin verlief stattdessen eindeutig negativ.

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung dieses Mischfutters sind aus Tabelle 16 ersichtlich. Der Zusatz der Toxine hatte vergleichsweise zum Futtermittel ohne Toxine auch hier keinen Einfluß auf die Mikroflora, sodaß nur die Werte für die toxinbelasteten Proben in Tabelle 16 aufgeführt sind. Sowohl die Keimzahl der Bakterien als auch der Pilze stieg bei Einstellung des Futtermittelwassergehaltes auf 30% stark an. Mit zunehmendem Verderb des Futtermittels nahm die Keimzahl, insbesondere der Hefen und Schimmelpilze, stark ab. Das Wachstum der gramnegativen Stäbchen reduzierte sich zu Gunsten von Bakterien der Familie Micrococcaceae und der Gattung Bacillus.

Bereits nach zwei Wochen der Lagerung des Mischfutters 79/84 waren T-2 Toxin und DAS im nicht sterilisierten Futtermittel größtenteils zu HT-2 Toxin und MAS transformiert worden, wobei zwischen dem Ansatz mit 1% Propylenglycol und dem Ansatz mit 2% Propylenglycol kein wesentlicher Unterschied im Toxingehalt bestand. Mit 1% Propylenglycol konnte ein Restgehalt von 14,2% T-2 Toxin und 18,6% DAS und mit 2% Propylenglycol ein Restgehalt von 16,6% T-2 Toxin und 19,8% DAS ermittelt werden. Nach vier Lagerungswochen wurden diese Toxine teilweise nur noch in Spuren detektiert (vgl. Tab.17). Im sterilisierten, mit Toxin versetzten Futter waren sie jedoch über den gesamten Versuchszeitraum nahezu unverändert nachweisbar. Positive Ergebnisse im Hauttoxizitätstest bestätigten das jeweilige Resultat der gaschromatographischen Analyse (vgl. Tab.17).

Tabelle 17: Ergebnisse der mykotoxikologischen Untersuchungen des mit T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol versetzten Mischfutters 79/84 nach unterschiedlicher Lagerungszeit

Lagerungs- zeit (Wochen)	pH- Wert	Hauttoxizitäts- test Frak.3 Frak.4+5		Toxingehalt µg/50 g
Futtermittel mit lebensfähigen Keimen und 1% Propylenglycol				
2	6,3	∅	+	7,1 T-2 Toxin 59,6 HT-2 Toxin 9,3 DAS 24,5 MAS
4	6,8	∅	∅	1,2 T-2 Toxin 19,9 HT-2 Toxin ∅ DAS 14,3 MAS
8	7,6	∅	∅	∅ T-2 Toxin 13,6 HT-2 Toxin ∅ DAS 6,2 MAS
Futtermittel mit lebensfähigen Keimen und 2% Propylenglycol				
2	5,9	∅	∅	8,3 T-2 Toxin 22,0 HT-2 Toxin 9,9 DAS 27,0 MAS
4	6,8	∅	∅	∅ T-2 Toxin 27,4 HT-2 Toxin ∅ DAS 22,2 MAS
8	6,8	∅	∅	∅ T-2 Toxin 7,7 HT-2 Toxin ∅ DAS 4,8 MAS
Futtermittel mit abgetöteten Keimen und 1% Propylenglycol				
2	5,9	++	∅	30,0 T-2 Toxin ∅ HT-2 Toxin 55,5 DAS ∅ MAS
4	6,5	+	∅	39,1 T-2 Toxin ∅ HT-2 Toxin 65,2 DAS ∅ MAS
8	6,6	+	∅	31,8 T-2 Toxin ∅ HT-2 Toxin 63,1 DAS ∅ MAS

∅ = negativ ; + = Epidermisrötung ; ++ = Epidermisödem

Die drei in Abbildung 16 wiedergegebenen Gaschromatogramme zeigen deutliche Konzentrationsunterschiede von T-2 Toxin (2) und DAS (1) nach zwei Wochen Lagerung, je nachdem ob das Futtermittel lebensfähige oder abgetötete Keime enthalten hatte. Obwohl nur 96 mg Probenaliquot vom sterilisierten Futtermittel in den Gaschromatographen injiziert worden waren, sind die Toxinpeaks deutlich größer als bei dem keimhaltigen Probenmaterial, von welchem 144 mg Probenaliquot injiziert worden waren.

HT-2 Toxin und MAS wurden im Mischfutter mit den lebensfähigen Keimen bereits nach zweiwöchiger Lagerung nachgewiesen. Weitere Transformationsprodukte wie T-2 Triol und Neosolanol wurden nicht gefunden.

In Abbildung 17 und 18 ist die Transformation von T-2 Toxin zu HT-2 Toxin (Abb.17) und von DAS zu MAS (Abb.18) in dem nicht sterilisierten Futter mit Zusatz von 1% Propylenglycol (B) im Vergleich zu dem sterilisierten Futter (A) während der Lagerung von acht Wochen graphisch dargestellt. Die schwarzen Balken entsprechen jeweils den Mengen der zugesetzten Trichothecene T-2 Toxin und DAS. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Mengen dieser Toxine in dem sterilisierten Futter über den gesamten Versuchszeitraum nahezu konstant blieben. Aus der Abbildung ersichtliche Konzentrationsabweichungen sind auf Schwankungen in den Analysenergebnissen zurückzuführen, die unvermeidbar sind. In den Ansätzen mit dem nicht sterilisierten Futter war die T-2 Toxin- bzw. DAS-Konzentration nach 14 Tagen bereits deutlich verringert. Nach vier Wochen der Lagerung war T-2 Toxin noch in Spuren und DAS nicht mehr nachweisbar.

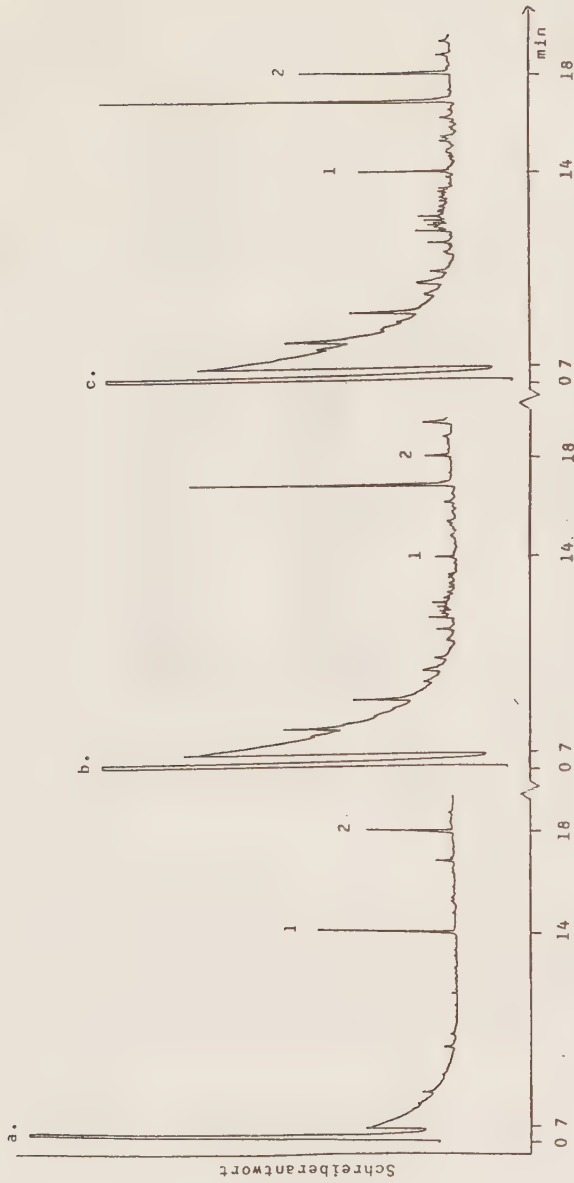


Abbildung 16: Gaschromatographischer Nachweis von Diacetoxyscirpenol (1) und T-2 Toxin (2) in Mischfutter 79/84
a. sterilisiertes Futter nach zweiwöchiger Lagerungszeit (96 mg Probenaliquot injiziert)
b. nicht sterilisiertes Futter nach zweiwöchiger Lagerungszeit (144 mg Probenaliquot injiziert)
c. Coinjektion von keimhaltigem Futter und T-2 Toxin- und Diacetoxyscirpenol-Standardtoxin

Schraffiert ist jeweils das entstandene HT-2 Toxin bzw. MAS dargestellt. Auch die Menge dieser Toxine verringerte sich im Laufe der Lagerung bis zu acht Wochen erheblich.

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen wurden in Tabelle 18 zusammengefaßt. Die Keimzahlen waren mit und ohne Zusatz von T-2 Toxin und DAS annähernd gleich. Der Zusatz von 2% Propylenglycol wirkte sich zunächst negativ auf das Wachstum der Pilze aus. Nach vier Wochen der Lagerung war auch Pilzwachstum zu verzeichnen. Mit einer Ausnahme konnten in den Proben mit Zusatz von 1% Propylenglycol nach achtwöchiger Lagerung keine Pilze mehr gefunden werden. Dies war möglicherweise durch den stärkeren bakteriellen Verderb des Futters bedingt. Propylenglycol hatte einen wachstumshemmenden Effekt auf gramnegative Stäbchenbakterien. Schon nach zweiwöchiger Lagerung konnten fast ausschließlich saprophytäre Haufenkokken der Familie Micrococcaceae gefunden werden.

In allen drei mit T-2 Toxin und mit DAS versetzten Mischfuttermehlen, bei denen die futtermittleigene Mikroflora nicht abgetötet worden war, konnten diese Toxine nach acht- bzw. zehnwöchiger Lagerung gaschromatographisch nicht mehr nachgewiesen werden. Im sterilisierten Futter dagegen wurden T-2 Toxin und DAS über den gesamten Versuchszeitraum mengenmäßig nahezu unverändert festgestellt. Mit dem natürlichen Keimbesatz in den Mischfuttermehlen waren T-2 Toxin zu HT-2 Toxin, und DAS zu MAS transformiert worden (FM 291/83 und FM 79/84). Selbst diese Toxine waren bei Versuchsende nur noch in geringen Mengen vorhanden (FM 79/84) oder sogar vollständig verschwunden (FM 291/83). Die Bildung weiterer Transformationsprodukte konnte jedoch nicht bestätigt werden. Alle Untersuchungen des

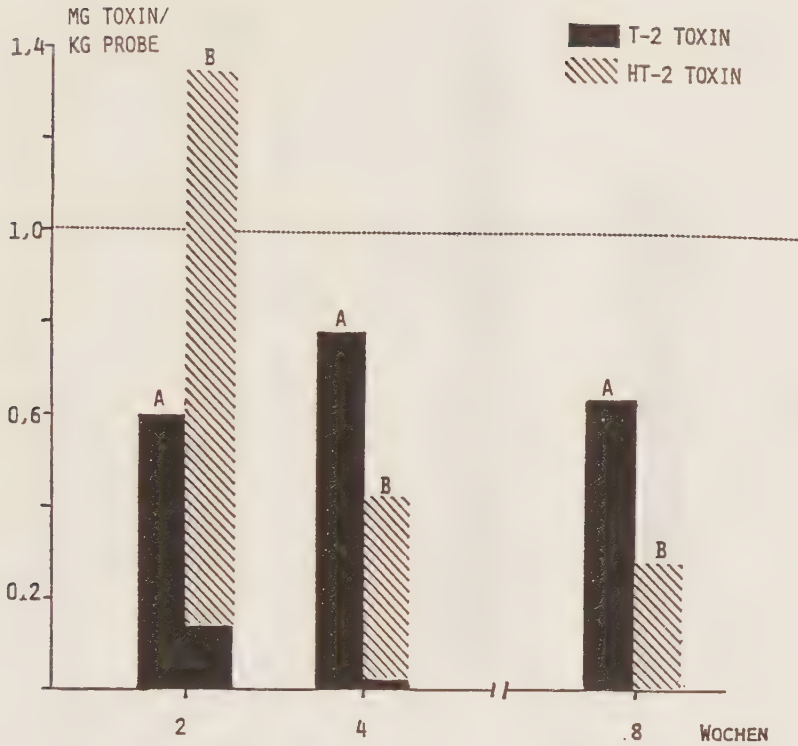


ABB.17: VERGLEICH DER TRANSFORMATION VON T-2 TOXIN ZU HT-2 TOXIN IM STERILISIERTEN (A) UND NICHT STERILISIERTEN FUTTER (B) 79/84 MIT 1% PROPYLENGLYCOL WÄHREND EINER 8-WÖCHIGEN LAGERUNGSZEIT (T-2 TOXINZUSATZ 1MG/KG FUTTER).

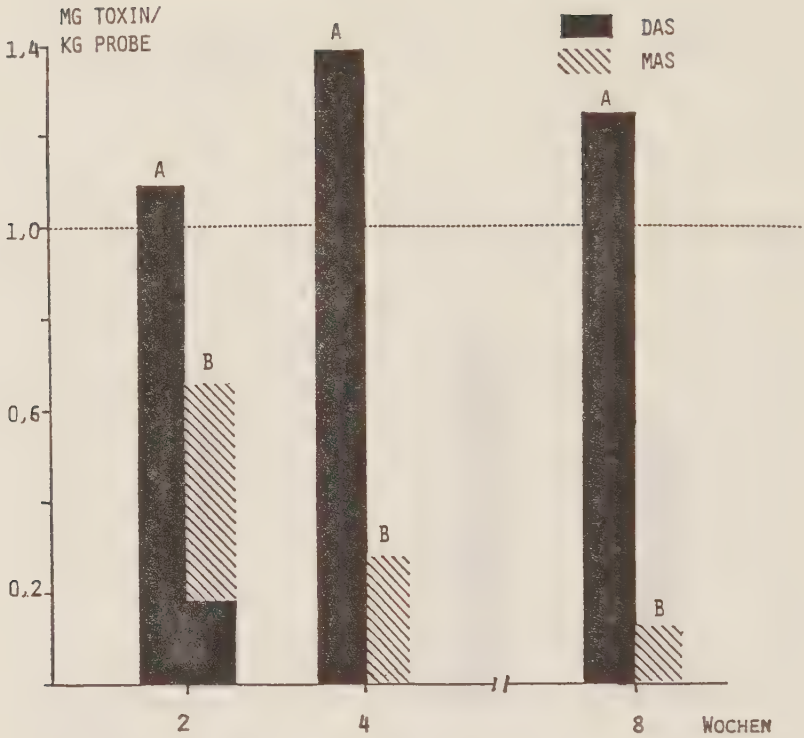


ABB.18: VERGLEICH DER TRANSFORMATION VON DIACETOXYSCIRPENOL (DAS) ZU MONOACETOXYSCIRPENOL (MAS) IM STERILISIERTEN (A) UND NICHT STERILISIERTEN FUTTER (B) 79/84 MIT 1% PROPYLENGLYCOL WÄHREND EINER 8-WÖCHIGEN LAGERUNGS-ZEIT (DAS-ZUSATZ 1MG/KG FUTTER).

Tabelle 18: Keimgehalte des Mischfutters 79/84 während eines mehrwöchigen Lagerungszeitraumes unter Berücksichtigung von Toxin- und Propylenglycolzusatz (Pg).

Bebrütungs- zeit (Wochen)	Bakterien				Keimzahl/g Futter				Schimmelpilze	
	Futtermittel		Hefen		Futtermittel		Futtermittel		Futtermittel	
	mit Toxin + 1% Pg	ohne Toxin + 1% Pg + 2% Pg	mit Toxin + 1% Pg	ohne Toxin + 1% Pg + 2% Pg	mit Toxin + 1% Pg + 2% Pg	ohne Toxin + 1% Pg + 2% Pg	mit Toxin + 1% Pg + 2% Pg	ohne Toxin + 1% Pg + 2% Pg	mit Toxin + 1% Pg + 2% Pg	ohne Toxin + 1% Pg + 2% Pg
0		$2,5 \times 10^5$ B, M, G, E		$< 10^2$					$1,6 \times 10^4$ Ac, P	
2	$1,3 \times 10^8$ M	$1,2 \times 10^8$ M	$3,6 \times 10^8$ M	$2,6 \times 10^7$ M	$1,0 \times 10^6$ T	$< 10^2$	$7,0 \times 10^6$ T	$< 10^2$	$2,0 \times 10^5$ Ac, Af, P	$7,0 \times 10^5$ Ac, Af, P
4	$9,8 \times 10^8$ M	$3,5 \times 10^8$ M	$2,5 \times 10^9$ M	$2,6 \times 10^8$ M	$1,9 \times 10^7$ T	$3,1 \times 10^7$ T	$7,3 \times 10^7$ T	$3,1 \times 10^7$ T	$4,0 \times 10^7$ Ac, Af, P	$8,0 \times 10^7$ Ac, Af, P
8	$6,8 \times 10^8$ M	$1,4 \times 10^9$ M	$6,7 \times 10^8$ M	$7,0 \times 10^8$ M	$< 10^2$	$1,1 \times 10^8$ T	$< 10^2$	$2,9 \times 10^8$ T	$6,0 \times 10^6$ Ac, P	$1,6 \times 10^6$ Ac, P
										$< 10^2$ Ac, P
										$1,4 \times 10^7$ Ac, P

$< 10^2$ = unterhalb der Nachweisgrenze quantitativer Oberflächenverfahren

B = Bacillusarten

M = Micrococcaceae bzw. Haufenkokken, saprophytär

G = gelb pigmentierte gramnegative Stäbchenbakterien der Gattung Erwinia aus der Familie der Enterobacteriaceae

E = Enterobacteriaceae (KES-Gruppe, Citrobacter u.a., ausgenommen Gattung Erwinia (s.o.) sowie Proteuskeime und Salmonellen)

T = Trichosporonarten P = Penicillium-Arten

Af = Aspergillus flavus Ac = Aspergillus candidus-Gruppe

sterilisierten Futters auf HT-2 Toxin und MAS verliefen negativ. Die Ergebnisse der Prüfungen im Hauttoxizitätstest standen weitgehend in Einklang mit den Resultaten der gaschromatographischen Analyse. T-2 Toxin und DAS wurden im sterilisierten Futter nicht abgebaut, während diese Toxine im nicht sterilisierten Futter zu den stärker polaren Substanzen HT-2 Toxin und MAS mit geringerer Hauttoxizität (vgl. Tab.2) transformiert wurden.

Während der zehnwöchigen Lagerung des Mischfutters 78/84 war eine starke Alkalisierung dieses Futtermittels zu verzeichnen (vgl. Tab.16). Diese dürfte auf den hohen Wassergehalt und den dadurch bedingten hochgradigen bakteriellen Verderb dieses Futtermittels zurückzuführen sein. Die Transformation der Toxine war jedoch nicht nur durch eine alkalische Hydrolyse bedingt. Dies zeigten die pH-Messungen im Falle des Mischfutters 79/84 (vgl. Tab.17). Bei dem Feuchtigkeitsgehalt von 19% und einem Zusatz von 1% Propylenglycol traten geringe pH-Verschiebungen in den alkalischen Bereich erst nach vier Wochen auf. Der Zusatz von 2% Propylenglycol hielt das pH des Futters im schwach sauren bis neutralen Bereich. Es erfolgte dennoch ein Abbau der Toxine (vgl. Tab.17). Die pH-Werte im sterilisierten Futter blieben über den gesamten Versuchszeitraum unverändert; sie lagen im schwach sauren bis neutralen Bereich.

3.3.2.5. In Grünmaissilage

Der mit T-2 Toxin und DAS versetzte Grünmais wies nach einer Silierungsdauer von 24 Stunden bei gaschromatographischer Analyse nahezu keines der zugesetzten Toxine mehr auf. Es konnten noch 1,8% des T-2 Toxins gefunden werden, wohingegen DAS vollständig

verschwunden war. HT-2 Toxin und MAS lagen zu diesem Zeitpunkt bereits in Konzentrationen von 40,4 µg bzw. 31,0 µg/50 g Silage vor. Diese Toxinmengen blieben über einen dreiwöchigen Silierungszeitraum nahezu konstant.

Nach dreiwöchiger Lagerung mit Luftzutritt waren diese Toxinmengen deutlich höher.

Nach einer Silierungszeit von sechs Wochen konnten die höchsten Mengen an HT-2 Toxin und an MAS detektiert werden. Bei Beendigung der Silierung nach vier Monaten war HT-2 Toxin völlig verschwunden, wohingegen MAS noch entsprechend einer Menge von über 50% vorhanden war. Die zweimonatige Belüftung eines Versuchsansatzes im Anschluß an eine viermonatige Silierung hatte eine weitere Reduzierung des MAS-Gehaltes zur Folge (vgl. Tab.19).

Ein Vorliegen weiterer Transformationsprodukte wie T-2 Triol und Neosolaniol konnte sowohl in allen Silageproben als auch in den belüfteten Versuchsansätzen ausgeschlossen werden.

Die pH-Werte aller Ansätze lagen während des gesamten Untersuchungszeitraums im sauren Bereich (vgl. Tab.20). Eine Transformation von T-2 Toxin zu HT-2 Toxin und von DAS zu MAS durch alkalische Hydrolyse kann daher ausgeschlossen werden.

Die Mengen an Gesamtsäure waren in der Silage und dem belüfteten Ansatz mit Toxinzusatz geringer als in den Kontrollen ohne Toxinzusatz. Dies machte sich vor allem durch ein höheres pH und einen verminderten Anteil an Milchsäure bemerkbar. Zugleich war jedoch der Gehalt an Essigsäure und Ammoniak erhöht, und ab der sechsten Silierungswoche wurde Buttersäure nachgewiesen. In der sechsten Woche der Silierung hatte der Anteil an Milchsäure in den toxinhaltigen Proben zugunsten eines Anstieges des Gehaltes an Essigsäure und Ammoniak stark abgenommen, während dies in den nicht mit Toxin versetzten Ansätzen erst im vierten Silierungsmonat verzeichnet werden konnte (vgl. Tab.20).

Tabelle 19: Ergebnisse der mykotoxikologischen Untersuchung von mit T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol versetztem Grünmais nach unterschiedlicher Silierungsdauer und Lagerungszeit

Zeitpunkt der Unter- suchung	Hauttoxizitäts- test		Toxingehalt µg/50 g Silage
	Frak.3	Frak.4+5	
1 Tag	∅	++	0,9 T-2 Toxin 40,4 HT-2 Toxin ∅ DAS 31,0 MAS
3 Tage	∅	++	∅ T-2 Toxin 42,7 HT-2 Toxin ∅ DAS 38,6 MAS
1 Woche	∅	++	5,0 T-2 Toxin 34,0 HT-2 Toxin ∅ DAS 35,1 MAS
3 Wochen	∅ (∅)	++ (++)	0,7 (∅) T-2 Toxin 38,1 (57,2) HT-2 Toxin 2,2 (2,3) DAS 29,2 (43,9) MAS
6 Wochen	∅	++	0,9 T-2 Toxin 63,4 HT-2 Toxin ∅ DAS 50,0 MAS
4 Monate	∅	∅	∅ T-2 Toxin ∅ HT-2 Toxin ∅ DAS 35,0 MAS
6 Monate*	∅	∅	∅ T-2 Toxin ∅ HT-2 Toxin ∅ DAS 29,0 MAS

∅ = negativ; ++ = Epidermisödem;

* = nach Beendigung der Silierung, zweimonatige aerobe Lagerung

() = Werte des aerob gelagerten Grünmaises

Tabelle 20: Ergebnisse der chemischen Untersuchung von toxinhaltigem⁺ und toxinfreiem Grünmais nach unterschiedlicher Silierungsdauer und Lagerungszeit

Zeitpunkt der Untersuchung	Gesamtsäure(%) mit Toxin ohne Toxin	Milchsäure(%) mit Toxin ohne Toxin	Essigsäure(%) mit Toxin ohne Toxin	Buttersäure(%) mit Toxin ohne Toxin	Ammoniak(%) mit Toxin ohne Toxin	pH-Wert mit Toxin ohne Toxin
1 Tag	0,53 0,92	0,43 1,10	0,13 0,19	0,07 Ø	0,015 0,015	4,45 3,95
3 Tage			0,15 0,13	Ø	0,005 0,015	4,75 3,84
1 Woche	1,01	1,39	0,27 0,17	Ø	0,011 0,012	3,81 3,60
3 Wochen	0,97 (0,98)	1,26 (1,19)	0,40 (0,53)	Ø (Ø)	0,014 (0,045)	4,23 (4,51)
6 Wochen	0,86	1,36	0,29 0,84	0,03 Ø	0,022 0,089	3,78 5,40
4 Monate	0,94	1,07	0,72	0,05 Ø	0,076	5,15
6 Monate*	-	1,92	-	-	0,194	5,34

Ø = negativ

- = nicht untersucht

() = Werte des aerob gelagerten Grünmaises

* = nach Beendigung der Silierung, zweimonatige aerobe Lagerung

+ = 1 mg/kg T-2 Toxin und 1 mg/kg Diacetoxycirpenol

4. Diskussion

Die Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien, chlorophyllfreien Algen, Hefen und Schimmelpilzen gegenüber den Trichothecenen T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol (DAS) in verschiedenen Konzentrationen zeigte einen wachstumshemmenden Effekt dieser Toxine auf Mikroorganismen mit eukaryontischem Zellsystem. Im Gegensatz dazu entwickelten sich alle 45 geprüften Prokaryontenstämme in Gegenwart von 100 µg T-2 Toxin bzw. DAS im Agarlochtest ungehindert. Ähnliche Ergebnisse werden in vergleichbaren Untersuchungen von BRIAN et al. (1961), sowie von BURMEISTER und HESSELTINE (1970) beschrieben. BURMEISTER und HESSELTINE (1970) prüften das Wachstum von 54 Bakterienstämmen in Gegenwart von 50 µg T-2 Toxin/Testblättchen und konnten keine Wachstumshemmung feststellen. BRIAN et al. (1961) beobachteten keine Hemmung des Wachstums von Bakterien dreier verschiedener Gattungen bei Zusatz von 200 µg DAS/ml Medium.

Bei den eigenen Versuchen hatten sich mit Ausnahme eines Stammes von *Candida albicans* und *Fusarium acuminatum* alle anderen Hefen und Schimmelpilze, sowie auch die getesteten Algen der Gattung *Prototheca* gegenüber 25 µg T-2 Toxin als sensibel oder mäßig sensibelerwiesen. Die Resistenz von *Candida albicans* gegenüber T-2 Toxin wurde auch schon von anderen Untersuchern (BURMEISTER und HESSELTINE, 1970; SUKROONGREUNG et al., 1984) beschrieben. Durch DAS wurde vor allem das Wachstum der Algen und Hefen gehemmt. Unter den Schimmelpilzen erwies sich nur der geprüfte Stamm von *Eurotium* als empfindlich. Nach den Untersuchungen von BRIAN et al. (1961), in welchen Pilzarten aus zehn verschiedenen Gattungen getestet wurden, hemmte DAS in einer Konzentration von 100 µg/ml Medium nur das Auskeimen der Sporen von *Penicillium digitatum*.

Für die unterschiedliche Empfindlichkeit von Prokaryonten und Eukaryonten gegenüber Trichothecenen sind vermutlich Unterschiede im Zellwandaufbau und den ribosomalen Strukturen verantwortlich zu machen. CHIBA et al. (1972) nehmen an, daß infolge des Fehlens von Trepennstrukturen in der Bakterienzellwand eine Penetration der Toxine in die Zelle verhindert wird. Für die differierende Toxinwirkung von T-2 Toxin gegenüber den Eukaryonten scheint ebenfalls das Permeationsvermögen des Toxins in die Zelle maßgeblich zu sein (CUNDLIFFE et al., 1974; SCHAPPERT und KHACHATOURIANS, 1984).

Nach Untersuchungen von UENO et al. (1971 und 1973) und von UENO (1977) wird die Vermehrung der Bakterienzelle durch Trichothecene nicht beeinflußt. Nach Ansicht der Autoren ist dies auf eine fehlende Hemmung der Synthesereaktionen in der Zelle zurückzuführen. Im Gegensatz dazu besteht eine Wirkung der Toxine auf die Zellteilung und Proteinsynthese der eukaryontischen Zellen (UENO und YAMAKAWA, 1970; CUNDLIFFE et al., 1974; SCHINDLER, 1974; WEI und McLAUGHLIN, 1974; LIAO et al., 1976; STAFFORD und McLAUGHLIN, 1982). Dies beruht auf einer starken Affinität der Toxine gegenüber den 80S Ribosomen, und zwar insbesondere den 60S Untereinheiten der Eukaryonten (UENO, 1983 zit. WEI et al., 1974; SCHINDLER et al., 1974). Zur Wirkung kommen die Trichothecene entweder in der Initiationsphase oder in der Elongations- und Terminationsphase der Proteinsynthese. Hierfür werden die jeweils unterschiedlichen Substituenten am Trichothecangrundgerüst verantwortlich gemacht (CUNDLIFFE et al., 1974; SCHINDLER, 1974; WEI und McLaughlin, 1974). Im Unterschied zu den Eukaryonten haben die Prokaryonten 70S Ribosomen mit 50S und 30S Untereinheiten (DOETSCH und COOK, 1973; KAWAPINSKI, 1974). Darauf beruht möglicherweise die mangelnde Haftung der Toxine an den Ribosomen der Bakterien und ihre geringere toxische Wirkung gegenüber Prokaryonten. Darüberhinaus können für

die geringere Toxizität der Trichothecene diesen gegenüber auch noch Exoenzyme verantwortlich sein, welche an das Kulturmedium abgegeben werden (KATO, I., 1970). Ähnliche Mechanismen, wie sie von penicillinasebildenden, penicillinresistenten Bakterien bekannt sind, können womöglich eine Transformation der Toxine zu weniger toxischen Verbindungen auch außerhalb der Bakterienzelle bewirken.

Von den 19 auf ihr Transformationsvermögen von T-2 Toxin und DAS in Standard-I-Bouillon geprüften Bakterienstämmen, waren sowohl Spezies der Gattung *Bacillus* und *Staphylococcus*, als auch alle geprüften gramnegativen Stäbchenbakterien an der Transformation dieser Toxine zu HT-2 Toxin und T-2 Triol bzw. zu Monoacetoxyscirpenol (MAS) und teilweise auch zu Scirpentriol (SCT) beteiligt. Vor allem die Spezies der Gattung *Bacillus* und unter diesen insbesondere ein Stamm von *Bacillus megaterium* zeichneten sich durch ihr Toxintransformationsvermögen aus. *Bacillus megaterium* baute innerhalb von sieben Tagen T-2 Toxin vollständig zu HT-2 Toxin und T-2 Triol und DAS vollständig zu MAS und SCT ab.

CLARIDGE und SCHMITZ (1978) stellten bei ihren Versuchen der mikrobiellen Transformation des DAS-Moleküls eine Bildung von drei isomeren Monoacetaten aus DAS fest. Bei den eigenen Untersuchungen wurde 15-Acetoxyiscirpendiol nachgewiesen, doch kann die Entstehung auch anderer Monoacetate nicht ausgeschlossen werden. UENO et al. (1983) beobachteten die Bildung von SCT aus DAS in einem Medium, in welchem *Curtobacterium* sp. Stamm 114-2 DAS als Kohlenstoff- bzw. Energiequelle angeboten wurde.

Da bei den eigenen Untersuchungen stets zunächst MAS und erst nach längerer Bebrütungszeit auch geringe Mengen an SCT nachzuweisen waren, ist anzunehmen, daß die Transformation von DAS durch die geprüften Bakterienstämme über MAS als Zwischenprodukt erfolgt. Die Untersuchungen von UENO et al. (1983) zeigten den stufenweisen Abbau von T-2 Toxin durch Bakterien über HT-2 Toxin zu T-2 Triol.

Auch bei den eigenen Untersuchungen wurde zuerst die C-4 Esterbindung und anschließend die C-15 Esterbindung des T-2 Toxin-Moleküls hydrolysiert. Von einer mikrobiellen Transformation des T-2 Toxins zu Neosolaniol berichten YOSHIZAWA et al. (1980). Dies konnte von UENO et al. (1983) jedoch nicht bestätigt werden. Bei den eigenen Untersuchungen waren zwar massenspektrometrisch geringe Mengen von Neosolaniol und zu dem auch noch von T-2 Tetraol nachweisbar, es scheint aber jedoch die Esterbindung in C-8-Position mikrobiellen Einflüssen gegenüber sehr stabil zu sein.

Für die am T-2 Toxin-Molekül stattfindende Deacetylierung werden von verschiedenen Autoren sowohl intrazelluläre Esterasen der Mikroorganismen, als auch deren extrazelluläre Esterasen, welche an das umgebende Medium abgegeben werden, verantwortlich gemacht (YOSHIZAWA et al., 1980; UENO et al., 1983).

Bei den eigenen Versuchen waren in den Bouillonkulturen meist pH-Verschiebungen in den alkalischen Bereich zu verzeichnen, weshalb zu Kontrollzwecken alkalisierte (pH 9,2), sterile, mit T-2 Toxin und DAS versetzte Medien untersucht wurden. Die dabei beobachtete Transformation von T-2 Toxin zu HT-2 Toxin und T-2 Triol und von DAS zu MAS und SCT war, verglichen mit den Vorgängen in den keimhaltigen Medien zeitlich deutlich verzögert. Außerdem entstanden die Umwandlungsprodukte T-2 Triol und SCT nur in geringen Mengen. Bei Berücksichtigung des Zeitfaktors wurde bei allen Untersuchungen T-2 Toxin schneller umgebaut als DAS. Dies zeigt, daß DAS sowohl mikrobiellen, als auch chemischen Einflüssen gegenüber beständiger ist, was durch die unterschiedliche Substitution am C-8 Atom erklärt werden kann.

Nicht nur in Kulturen, sondern auch während der Lagerung von Mischfutter und während der Silierung von Grünmais wurden T-2 Toxin und DAS zu HT-2 Toxin bzw. MAS transformiert. Der Gehalt dieser beiden Transformationsprodukte nahm im Laufe der Lagerungs- bzw. Silierungsdauer kontinuierlich ab. Im Falle des Mischfutters 291/83 konnten

nach 10-wöchiger Lagerung Toxine nicht mehr nachgewiesen werden.

Außer HT-2 Toxin konnten weitere Metaboliten von T-2 Toxin wie T-2 Triol und Neosolaniol nicht detektiert werden.

Möglicherweise wurde, wie bereits UENO et al. (1983) aufgrund ihrer in vitro-Ergebnisse mit *Curtobacterium* sp. vermuteten, die Grundstruktur der Trichothecene zerstört.

T-2 Toxin und DAS waren in sterilisierten Kontrollansätzen über den gesamten Versuchszeitraum in nahezu unveränderter Konzentration wiederzufinden. Es konnten auch keine Transformationsprodukte detektiert werden. Über vergleichbare Ergebnisse berichten CHANG und LYND (1970), welche die Aflatoxintransformation in sterilisierten und nicht sterilisierten Bodenproben untersuchten. Daraus kann geschlossen werden, daß die Toxine bei den eigenen Untersuchungen im nicht sterilisierten Futter eventuell durch die enzymatische Tätigkeit dessen heterogener Keimflora abgebaut wurden. Die Beteiligung von pflanzlichen Enzymsystemen muß dabei mit in Betracht gezogen werden (MILLER et al., 1984).

Versuche von HAFEZ und MEGALLA (1982) und DUTTON et al. (1984) zeigten, daß bei der Silierung auch andere Mykotoxine wie Aflatoxin B₁ und Patulin abgebaut werden. Die Silierung von mykotoxinhaltigen Futtermitteln könnte sich somit als Verfahren zur Entgiftung anbieten und ist daher möglicherweise von praktischer Bedeutung. Ob durch die Silierung allerdings auch eine Transformation anderer Trichothecene als die in den vorliegenden Untersuchungen verwendeten, erzielt werden kann, bedarf noch ergänzender Untersuchungen.

In der mit Toxinen versetzten Silage war der Gesamtsäuregehalt, insbesondere die Mengen an Milchsäure, im Vergleich zu toxinfreien Kontrollansätzen geringer. Zugleich war der Anteil an Essigsäure und Ammoniak erhöht. Daraus kann auf eine Abweichung im Keimbesatz in

der toxinhaltigen Silage geschlossen werden. Möglicherweise waren die homofermentativen Lactobacillen gehemmt. Dadurch könnten Baccilluskeime, wie auch in den vorhergehenden Versuchen mit Bouillonkulturen oder andere heterofermentative Keime wie Clostridien und coliforme Keime an der Transformation der Toxine beteiligt gewesen sein. Der relativ frühe pH-Anstieg in der vergorenen, toxinhaltigen Silage in der sechsten Woche kann möglicherweise auf Verschiebungen der Keimrelationen zurückgeführt werden.

Bei der Anwendung des Verfahrens der Gärfutterbereitung ist eine rasche Entwicklung der Milchsäurebakterien wünschenswert, dagegen ist das Wachstum von anderen kohlenhydratvergärenden Keimen und Proteolyten weitgehend zu unterbinden. Möglicherweise wird dadurch aber wiederum die Toxintransformation verzögert.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse sollte in Zukunft bei Verdacht auf Kontamination von Futtermitteln mit Trichothecenen nicht nur auf die Toxine untersucht werden, die von den Pilzen meistens noch vor der Ernte auf der Pflanze gebildet werden, sondern auch auf deren Derivate. Wie die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen deutlich gezeigt haben, wurden die Trichothecene T-2 Toxin und DAS bereits während eines relativ kurzen Lagerungs- bzw. Silierungszeitraumes zu HT-2 Toxin bzw. MAS transformiert. Die von GAREIS und Mitarbeitern (1985) über das Vorkommen von Trichothecenen in Futtermitteln publizierten Ergebnisse, wonach neben T-2 Toxin auch dessen Abbauprodukte HT-2 Toxin und Neosolaniol nachweisbar waren, unterstreichen die Notwendigkeit, die Futtermittelanalytik auch auf den Nachweis dieser Abbauprodukte auszurichten. Dies wird durch die erst kürzlich erfolgte Detektion von MAS im Futter bestätigt (GAREIS, 1985, persönliche Mitteilung).

5. Zusammenfassung

Eine Auswahl von Mikroorganismen, die sowohl dem natürlichen Keimbesatz von Futtermitteln angehört, als auch gelegentlich durch faecale Verunreinigung ins Futter gelangt (Bakterien, 45 Stämme; chlorophyllfreie Algen, 2 Stämme; Hefen, 6 Stämme; Schimmelpilze, 5 Stämme), wurde zunächst auf ihre Empfindlichkeit gegenüber T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol (DAS) geprüft. In Abhängigkeit des Ergebnisses dieser Untersuchung erfolgte danach die Prüfung von 19 Bakterienstämmen in Standard-I-Bouillon und von 4 Bakterienstämmen im Medium nach UENO et al. (1983) auf ihre Befähigung zur Transformation dieser Toxine. Ergänzend dazu wurden mit Toxin versetzte Futtermittel (Mischfutter, Grünmais) während der Lagerung bzw. Silierung wiederholt qualitativ und quantitativ auf T-2 Toxin und DAS, sowie deren Derivate untersucht, um Rückschlüsse auf Vorgänge der Biotransformation unter natürlichen Bedingungen ziehen zu können.

Unter sterilen Kautelen und der Anwendung bewährter mikrobiologischer Verfahren wurden die Keime vorkultiviert und anschließend auf ihre Empfindlichkeit gegenüber T-2 Toxin und DAS im Agarlochtest überprüft.

Der Nachweis von T-2 Toxin und DAS, sowie deren Transformation in toxinversetzten Medien (Kulturmedien, Futtermittel) erfolgte nach Extraktion mit geeigneten Lösungsmitteln dünnschichtchromatographisch und gaschromatographisch. Stichprobenweise wurden die Ergebnisse massenspektrometrisch abgesichert.

Empfindlich gegenüber abgestuften Mengen von T-2 Toxin und DAS zeigten sich von den geprüften Mikroorganismen die chlorophyllfreien Algen, Hefen und Schimmelpilze, nicht jedoch die Bakterien,

Als unempfindlich gegenüber T-2 Toxin erwiesen sich von den Pilzen lediglich *Candida albicans* und *Fusarium acuminatum* (100 µg/Loch). DAS hemmte stattdessen alle Hefen, aber nur einen Schimmelpilzstamm der Gattung *Eurotium* (25 µg/Loch).

Von den Bakterien beteiligten sich Spezies der Gattung *Bacillus* und *Staphylococcus* sowie alle geprüften gramnegativen Stäbchenbakterien an der Transformation von T-2 Toxin zu HT-2 Toxin und T-2 Triol und von DAS zu Monoacetoxyscirpenol (MAS) und teilweise zu Scirpentriol (SCT). In Standard-I-Bouillon erwiesen sich insbesondere die geprüften *Bacillus*stämme als äußerst aktiv. Durch *Bacillus megaterium* wurden T-2 Toxin und DAS vollständig in ihre Hydrolyseprodukte umgewandelt. Das Wachstum der Bakterien in Standard-I-Bouillon war sehr häufig mit einer Alkalisierung des Mediums verbunden. Ein Abbau von Toxinen wurde auch ohne Gegenwart von Keimen in Kontrollansätzen mit alkalisiertem Medium (pH 9,2) beobachtet. Die Reaktion war jedoch verzögert und T-2 Triol und SCT entstanden in ungleich geringeren Mengen als in Gegenwart der Bakterien.

Im Medium nach UENO et al. (1983) erwiesen sich die Bakterien als weniger stoffwechselaktiv. Nur *E. coli* Stamm 1 transformierte sehr geringe Mengen T-2 Toxin zu HT-2 Toxin.

Drei gemahlene Mischfuttermittel und kurz gehexelter Grünmais wurden mit T-2 Toxin und DAS (jeweils 1 mg/kg) versetzt und 8 - 10 Wochen unter verschiedenen Bedingungen (Feuchtigkeitsgehalt, Zusatz von Konservierungsstoff) gelagert bzw. 4 Monate siliert. Bei allen Futtermitteln konnte ein Abbau von T-2 Toxin zu HT-2 Toxin und von DAS zu MAS beobachtet werden.

Die Transformation von T-2 Toxin und DAS erfolgte im Mischfutter größtenteils innerhalb der ersten zwei bis vier Lagerungswochen. Die Mengen an HT-2 Toxin und MAS nahmen im Laufe der Lagerung ab.

Weitere T-2 Toxintransformationsprodukte wie T-2 Triol und Neosolaniol wurden nicht nachgewiesen. In einem Futtermittel wurden nach 10-wöchiger Lagerung keine Trichothecene mehr detektiert. In autoklavierten Kontrollansätzen konnte das zugesetzte T-2 Toxin und DAS über den gesamten Versuchszeitraum in nahezu unveränderter Konzentration gefunden werden. Abbauprodukte wurden in diesen Kontrollansätzen nicht detektiert. Auf die Mischfutterflora hatten die Toxine keinen Einfluß.

Bereits nach einer 24-stündigen Silierungsdauer von Grünmais waren T-2 Toxin und DAS größtenteils zu HT-2 Toxin bzw. MAS transformiert. Eine Abnahme der Konzentration dieser Trichothecene wurde auch hierbei wiederum beobachtet. Nach 4-monatiger Silierungszeit war nur noch MAS in der Silage feststellbar. Zwischen toxinversetzter und nicht toxinversetzter Silage traten Unterschiede im Säuerungsgrad und Säuregehalt auf.

Summary

The transformation of the trichothecenes T-2 toxin and diacetoxyscirpenol by microorganisms.

A variety of microorganisms, belonging either to the natural bacterial flora of feedstuffs or to the fecal contaminants (bacteria, 45 strains; algae without chlorophyll, 2 strains; yeasts, 6 strains; moulds, 5 strains) were screened for their sensitivity to T-2 toxin and diacetoxyscirpenol (DAS). Depending on the results, 19 strains of bacteria were tested in standard-I-bouillon and 4 strains of bacteria in the medium according to UENO et al. (1983) with regard to their ability to transform these toxins. Additionally, the toxins were added to feedstuffs (mixed feeds, fresh maize); the content of T-2 toxin and DAS as well as their derivatives was repeatedly analyzed during storage or making silage, in order to obtain information on naturally occurring biotransformation.

Using aseptic precautions and well-established microbiological techniques the microorganisms were precultured, and then their sensitivity to T-2 toxin and DAS was tested in the agar-hole-diffusion-test.

The detection of T-2 toxin and DAS, as well as their transformation in different media (media for culturing, feedstuffs) was performed by thin-layer chromatography and gas chromatography, following the extraction with suitable solvents. In individual samples the results were reconfirmed by mass spectrometry.

Among the microorganisms tested towards graded amounts of T-2 toxin and DAS, algae without chlorophyll, yeasts and moulds were sensitive, but not the bacteria. Among the fungi only *Candida albicans* and *Fusarium acuminatum* (100 µg/hole) showed to be resistant to T-2 toxin. DAS however inhibited all of the yeasts, but

only one strain of the moulds, belonging to the genus *Eurotium* (25 µg/hole).

Among the bacteria species of the genus *Bacillus* and *Staphylococcus* and all of the gram-negative rod-shaped bacteria participated in the transformation of T-2 toxin to HT-2 toxin and T-2 triol and of DAS to monoacetoxyscirpenol (MAS) and in part to scirpentriol (SCT). Especially the strains of *Bacillus* proved to be very active in standard-I-bouillon. T-2 toxin and DAS were entirely converted to their products of hydrolysis by *Bacillus megaterium*. Very often, the bacterial growth in standard-I-bouillon was accompanied by an alkalisation of the medium. In alkaline media (pH 9,2) a transformation of the toxins was also observed, when no bacteria were present in these control samples. However, the reaction was delayed and T-2 triol and SCT were found in considerably smaller amounts than in the presence of bacteria.

In the medium according to UENO et al. (1983) bacteria proved to be metabolically less active. Only *E. coli* strain 1 transformed very small amounts of T-2 toxin to HT-2 toxin.

Three types of mixed feeds and maize (cut short) were contaminated artificially with T-2 toxin (1mg/kg) and DAS (1mg/kg) and were stored for 8 to 10 weeks under different conditions (humidity, addition of preservatives) or ensiled for 4 months.

In all of the feedstuffs a transformation of T-2 toxin to HT-2 toxin and of DAS to MAS could be observed.

In mixed feeds the transformation of T-2 toxin and DAS mainly took place during the first 2 to 4 weeks of storage. The amount of HT-2 toxin and MAS decreased during storage. Other transformation products of T-2 toxin such as T-2 triol and neosolaniol were not detected. In one sample of mixed feed no trichothecenes were found anymore after 10 weeks of storage.

In sterilized controls the previously added T-2 toxin and DAS was detected in almost undiminished amounts during the complete observation period. Transformation products were not found in these control samples. The toxins did not influence the flora of the mixed feeds.

In maize, ensiled for 24 hours, most of the T-2 toxin and DAS was transformed to HT-2 toxin and MAS. A decrease of these trichothecenes was observed again. After 4 months of making silage only MAS could be detected. Depending on the addition or lack of toxins in the silage differences were to be noted in the level of acidity and the formation of acids.

6. Literaturverzeichnis*

ARAI, T., ITO, T., KOYAMA, Y., 1967:

Antimicrobial activity of aflatoxins.

J. Bact., 93, 59 - 64.

ASHWORTH, L. J., SCHROEDER, H. W., LANGLEY, B. C., 1965:

Aflatoxins: Environmental factors governing occurrence in Spanish peanuts.

Sci., 148, 1228 - 1229.

BAUER, J., 1980:

Zur Leistungsfähigkeit mykotoxikologischer Untersuchungsmethoden.

Berl. Münch. tierärztl. Ws., 93, 354 - 358.

BERGEY'S Manual of systematic Bacteriology, 1984:

By: BERGEY, D. H., KRIEG, N. R., HOLT, J. G., Vol. 1

Williams and Wilkins, Baltimore, London

BOUTIBONNES; P., 1978:

A preliminary report about antibacterial properties of the mycotoxin zearalenone.

IRCS med. Sci., 6, 491

* Abkürzungen der Zeitschriften nach LEISTNER, O., 1981:

Internationale Titelabkürzungen (ITA), Biblio Verlag, Osnabrück

BOUTIBONNES, P., 1979:

Mise en évidence de l'activité antibactérienne de
quelques mycotoxins par utilisation de *Bacillus*
thuringiensis (Berliner).
Mycop., 67, 45 - 50.

BOUTIBONNES, P., AUFRAY, Y., MALHERBE, C., KOGBO, W., MARAIS, C.,
1984:

Propriétés antibactériennes et genotoxiques de 33 myco-
toxines.
Mycop., 87, 43 - 49.

BREWER, D., TAYLOR, A., 1967:

The biological properties of 3,6-epidithiadiketopiperazines.
Degradation of gliotoxin-B by *Bacillus subtilis* (HLX 373).
Can. J. Mikrob., 13, 1577 - 1589.

BRIAN, P. W., DAWKINS, A. W., GROVE, J. F., HEMMING, H. G.,
LOWE, D., NORRIS, G. L. F., 1961:

Phytotoxic compounds produced by *Fusarium equiseti*.
J. exp. Bot., 12, 1 - 12.

BROCE, D., GRODNER, R. M., KILLEBREW, R. L., BONNER, F. L., 1970:

Ochratoxins A and B confirmation by microbiological
assay using *Bacillus cereus mycoides*.
J. Ass. Off. Anal. Chem., 53, 616 - 619.

BUNGE, I., DIRHEIMER, G., RÜSCHENTHALER, R., 1978:

In vivo and in vitro inhibition of protein synthesis
in *Bacillus stearothermophilus* by ochratoxin A.

Biochem. biophys. res. Comm., 83, 398 - 405.

BURMEISTER, H. R., ELLIS, J. J., YATES, S. G., 1971:

Correlation of biological to chromatographic data for
two mycotoxins elaborated by *Fusarium*.

Appl. Microbiol., 21, 673 - 675.

BURMEISTER, H. R., HESSELTINE, C. W., 1966:

Survey of the sensitivity of microorganisms to aflatoxin.

Appl. Microbiol., 14, 403 - 404.

BURMEISTER, H. R., HESSELTINE, C. W., 1970:

Biological assays for two mycotoxins produced by
Fusarium tricinctum.

Appl. Microbiol., 20, 437 - 440.

CARSON, M. S., SMITH, T. K., 1983:

Role of bentonite in prevention of T-2 toxicosis
in rats.

J. Anim. Sci., 57, 1498 - 1506.

CHAIN, E., FLOREY, H. W., JENNINGS, M. A., 1942:

An antibacterial substance produced by *Penicillium*
claviforme.

Brit. J. Exp. Path., 23, 202 - 205.

CHANG, C.-M., LYND, J. Q., 1970:

Soil microfloral interactions with aflatoxin synthesis and degradation.

Mycol., 62, 978 - 986.

CHIBA, J., NAKANO, N., MOROOKA, N., NAKAZAWA, S., WATANABE, Y., 1972:

Inhibitory effects of fusarenon-X, a sesqui-terpene mycotoxin, on lipid synthesis and phosphate uptake in *Tetrahymena pyriformis*.

Jap. J. med. Sci. Bio., 25, 291 - 296.

CHU, F. S., CHANG, C. C., 1971:

Sensitivity of chicks to ochratoxins.

J. Ass. Off. Anal. Chem., 54, 1032 - 1034.

CHUNG, W. C., TRUCKSESS, M. W., GILES, A. L., FRIEDMAN, L., 1974:

Rabbit skin test for estimation of T-2 toxin and other skin-irritating toxins in contaminated corn.

J. Ass. Off. Anal. Chem., 57, 1121 - 1127.

CIEGLER, A., LILLEHOJ, E. B., PETERSON, R. E., HALL, H. H., 1966:

Microbial detoxification of aflatoxin.

Appl. Microbiol., 14, 934 - 939.

CIEGLER, A., PETERSON, R. E., 1968:

Aflatoxin detoxification: Hydroxydihydro-aflatoxin B₁.

Appl. Microbiol., 16, 665 - 666.

CLARIDGE, C. A., SCHMITZ, H., 1978:

Microbial and chemical transformations of some
12,13-epoxytrichothec-9,10-enes.
Appl. environ. Microbiol., 36, 63 - 67.

CLARIDGE, C. A., SCHMITZ, H., 1979:

Production of 3-acetoxyscirpene-4,15-diol from anguidine
(4,15-diacetoxyscirpene-3-ol) by *Fusarium oxysporum* f.
sp. vasinfection.
Appl. environ. Microbiol., 37, 693 - 696.

COLE, R. J., COX, R. H., 1981:

Handbook of fungal metabolites.
Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San
Francisco, 569 - 613.

COLE, R. J., DORNER, J. W., COX, R. H., CUNFER, B. M., CUTLER, H. G.,
STUART, B. P., 1981:

The isolation and identification of several trichothecene
mycotoxins from *Fusarium heterosporum*.
J. Nat. Prod., 44, 324 - 330.

COLE, R. J., KIRKSEY, J. W., 1971:

Aflatoxin G₁ metabolism by *Rhizopus* species.
J. Agr. Food Chem., 19, 222 - 223.

COLE, R. J., KIRKSEY, J. W., BLANKENSHIP, B. R., 1972:

Conversion of aflatoxin B₁ to isomeric hydroxy compounds
by *Rhizopus* spp..
J. Agr. Food Chem., 20, 1100 - 1102.

CONWAY, E. J., 1962:

Microdiffusion analysis and volumetric error.
Verlag Grosby Loockwood & son Ltd., London

CREPPY, E.-E., LUGNIER, A. A. J., FASIOLO, F., HELLER, K.,
RÖSCHENTHALER, R., DIRHEIMER, G., 1979:

In vitro inhibition of yeast phenylalanyl-tRNA synthetase
by ochratoxin A.
Chem. Biol. Interact., 24, 257 - 261.

CUNDLIFFE, E., CANNON, M., DAVIES, J., 1974:

Mechanism of inhibition of eukaryotic protein synthesis
by trichothecene fungal toxins.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 30 - 34.

DETROY, R. W., HESSELTINE, C. W., 1968:

Isolation and biological activity of a microbial con-
version product of aflatoxin B₁.
Nat., 219, 967.

DETROY, R. W., HESSELTINE, C. W., 1969:

Transformation of aflatoxin B₁ by steroid-hydroxylating
fungi.
Can. J. Microb., 15, 495 - 500.

DETZLER, W., 1985:

Zur Entgiftung von Trichothecenen mit physikalisch-
chemischen Methoden.
Diss. Vet. Med., Ludwig-Maximilians-Universität München.

DICKENS, F., JONES, H. E. H., 1963:

Further studies on the carcinogenic and the growth-inhibitory activity of lactones and related substances.
Br. J. Canc., 17, 100.

DOETSCH, R. N., COOK, T. M., 1973:

Introduction to bacteria and their ecobiology.
Medical and technical publishing Co. Ltd., Lancaster.

DOSTER, R. C., SINNHUBER, R. O., 1972:

Comparative rates of hydrolysis of ochratoxin A and B
in vitro.
Food Cosm. Toxicol., 10, 389 - 394.

DOYLE, M. P., APPLEBAUM, R. S., BRACKETT, R. E., MARTH, E. H., 1982:

Physical, chemical and biological degradation of
mycotoxins in foods and agricultural commodities.
J. Food Prot., 45, 964 - 971.

DOYLE, M. P., MARTH, E. H., 1978 a:

Aflatoxin is degraded by mycelia from toxigenic and
nontoxigenic strains of *Aspergilli* grown on different
substrates.
Mycop., 63, 145 - 153.

DOYLE, M. P., MARTH, E. H., 1978 b:

Aflatoxin is degraded at different temperatures and pH
values by mycelia of *Aspergillus parasiticus*.
Eur. J. appl. Microbiol. Biotechnol., 6, 95 - 100.

DOYLE, M. P., MARTH, E. H., 1979:

Peroxidase activity in mycelia of *Aspergillus parasiticus* that degrade aflatoxin.

Eur. J. appl. Microbiol. Biotechnol., 7, 211 - 217.

DUTTON, M. F., WESTLAKE, K., ANDERSON, M. S., 1984:

The interaction between additives, yeasts and patulin production in grass silage.

Mycop., 87, 29 - 33.

EMEH, C. O., MARTH, E. H., 1976:

Production of rubratoxin by *Penicillium rubrum* in a soy whey-malt extract medium.

J. Milk Fd. Techn., 39, 95 - 100.

EMEH, C. O., MARTH, E. H., 1978:

Degradation of rubratoxin by *Penicillium rubrum*.

Mycol., 70, 196 - 199.

ENOMOTO, M., SAITO, M., 1973:

Experimentally induced chronic liver injuries by the metabolites of *Penicillium islandicum* Sopp.

Acta Path. Jap., 23, 655.

EUGENIO, C. P., CHRISTENSEN, C. M., MIROCHA; C. J., 1970:

Factors affecting production of the mycotoxin F-2 by *Fusarium roseum*.

Phytopath., 60, 1055 - 1057.

- FRANK, H. K., ORTH, R., HERMANN, R., 1976:
Patulin in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft.
I. Kernobst und daraus hergestellte Produkte.
Z. Lebensmitt. Untersuch., 162, 149.
- GALTIER, P., ALVINERIE, M., 1976:
In vitro transformation of ochratoxin A by animal
microbial floras.
Ann. Rech. Vétér., 7, 91 - 98.
- GAREIS, M., 1983:
Untersuchungen zum gaschromatographischen Nachweis
und zur Bildung von Trichothecenen.
Diss. Vet. Med., Ludwig-Maximilians-Universität München.
- GAREIS, M., BAUER, J., GEDEK, B., 1985:
Fusarientoxine in Futtermitteln. Nachweis und Vorkommen
von Trichothecenen.
Tierärztl. Prax., Suppl., 1, 8 - 9.
- GEDEK, B., 1974:
Möglichkeiten und Grenzen der mikrobiologischen
Futtermittelkontrolle.
Dt. tierärztl. Ws., 81, 37 - 40 und 65 - 68.
- GEDEK, B., 1980:
Kompendium der medizinischen Mykologie.
Paul Paray Verlag, Berlin und Hamburg.

GODTFREDSEN, W. O., GROVE, J. F., TAMM, C., 1967:

Zur Nomenklatur einer neueren Klasse von Sesquiterpenen.
Helv. Chim. A., 174, 1666 - 1668.

GOLDBLATT, L. A., DOLLEAR, F. G., 1977:

Review of prevention, elimination and detoxification of
aflatoxins.
Pure appl. Chem., 49, 1759 - 1764.

HAFEZ, A. H., MEGALLA, S. E., 1982:

The potential value of silage in detoxifying aflatoxin B₁.
Mycop., 79, 31 - 34.

HARRI, E., LOEFFLER, W., SIGG, H. P., STÄHELIN, H., STOLL, C.,
TAMM, C., WIESINGER, D., 1962:

Über die Verrucarine und Roridine, eine Gruppe von
cytostatisch hochwirksamen Antibiotika aus Myro-
thecium-Arten.
Helv. Chim. A., 45, 839 - 853.

HAGLER, W. M., MIROCHA, C. J., PATHRE, S. V., BEHRENS, J. C., 1979:

Identification of the naturally occurring isomer of
zearalenol produced by *Fusarium roseum* 'Gibbosum' in
rice culture.
Appl. environ. Microbiol., 37, 849 - 853.

HANSEN, E., HAGEDORN, G., 1969:

Untersuchungen über Vorkommen und Wanderung von Afla-
toxin B₁ und seine Veränderung bei einigen lebensmittel-
technologischen Prozessen.
Z. Lebensmitt. Untersuch., 141, 139 - 145.

- HARWIG, J., CHEN, Y.-K., KENNEDY, B. P. C., SCOTT, P. M., 1973 a:
Occurrence of patulin and patulin-producing strains of
Penicillium expansum in natural rots of apple in
Canada.
Can. Inst. Fd. Technol. J., 6, 22.
- HARWIG, J., SCOTT, P. M., KENNEDY, B. P. C., CHEN, Y.-K., 1973 b:
Disappearance of patulin from apple juice fermented
by *Saccharomyces* spp..
J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment., 6, 45 - 46.
- HELLER, K., RÖSCHENTHALER, R., 1978:
Inhibition of protein synthesis in *Streptococcus*
faecalis by ochratoxin A.
Can. J. Microb., 24, 466 - 472.
- HELLER, K., SCHULZ, C., LÜSER, R., RÖSCHENTHALER, R., 1975:
The inhibition of bacterial growth by ochratoxin A.
Can. J. Microb., 21, 972 - 979.
- HORVÁTH, I., VARGA, J. M., 1961 a:
Enzymic inactivation of trichothecin and crotochin.
Nat., 192, 88.
- HORVÁTH, I., VARGA, J. M., 1961 b:
Trichothecinase.
Acta Microbiol. Hung., 9, 117 - 121.

- HULT, K., TEILING, A., GATENBECK, S., 1976:
Degradation of ochratoxin A by a ruminant.
Appl. environ. Microbiol., 32, 443 - 444.
- ICHINOE, M., KURATA, H., SUGIURA, Y., UENO, Y., 1983:
Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with special reference to production of trichothecenes and zearalenone.
Appl. environ. Microbiol., 46, 1364 - 1369.
- ITOH, Y., MORISHITA, Y., AIBARA, K., 1978:
Degradation of aflatoxin B₁ by rat intestinal flora.
Nipp. Nogeik. Kais., 52, 195 - 199.
- ITOH, Y., MORISHITA, Y., AIBARA, K., 1979:
Degradation of aflatoxin B₁ by microorganisms isolated from the feces of rat.
Nipp. Nogeik. Kais., 53, 97 - 102.
- JEMMALI, M., UENO, Y., ISHII, K., FRAYSSINET, C., ETIENNE, M., 1978:
Natural occurrence of trichothecenes (nivalenol, deoxynivalenol, T-2), and zearalenone in corn
Separatum Experientia, 34, 1333.
- KALLELA, K., VASENIUS, L., 1982:
The effects of rumen fluid on content of zearalenone in animal fodder.
Nord. Vet.-Med., 34, 336 - 339.

KATO, I., 1970:

Relationship of bacterial structure and metabolism to toxin production.

In: AJL, S. J., KADIS, S., MONTIE, T. C., Microbial toxins, Vol. 1, Bacterial protein toxins.

Academic press, New York, London, 401 - 443.

KAWAPINSKI, J. B. G., 1974:

Molecular arrangement and assembly.

In: KAWAPINSKI, J. B. G., Molecular microbiology
John Wiley and sons, New York, London, Sidney

Toronto, 7 - 45.

KIERMEIER, F., RUFFER, L., 1974:

Veränderung von Aflatoxin B₁ in alkalischer Lösung.

Z. Lebensmitt. Untersuch., 155, 129 - 141.

KIESSLING, K.-H., PETTERSSON, H., SANDHOLM, K., OLSEN, M., 1984:

Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria.

Appl. environ. Microbiol., 47, 1070 - 1073.

KING, R. R., McQUEEN, R. E., LEVESQUE, D., GREENHALGH, R., 1984:

Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganisms.

J. Agr. Fodd Chem., 32, 1181 - 1183.

KIRCHGESSNER, M., 1975:

Tiernährung. 3. Auflage

DLG-Verlag, Frankfurt.

- KONRAD, I., RÜSCHENTHALER, R., 1977:
Inhibition of phenylalanine tRNA synthetase from
Bacillus subtilis by ochratoxin A.
FEBS Letters, 83, 341 - 347.
- KORZYBSKI, T., KURYLOWICZ, W., 1961:
Antibiotica.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- KROGH, P., ELLING, F., FRIIS, C., HALD, B., LARSEN, A. E.,
LILLEHOJ, E. B., MADSEN, A., MORTENSEN, H. P.,
RASMUSSEN, F., RAVNSKOV, U., 1979:
Porcine nephropathy induced by long-term ingestion
of ochratoxin A.
Vet. Path., 16, 466 - 475.
- LAFONT, J., ROMAND, A., LAFONT, P., 1981:
Effects de mycotoxines sur l'activité fermentaire de
Saccharomyces cerevisiae.
Mycop., 74, 119 - 123.
- LIAO, L.-L., GROLLMAN, A. P., HORWITZ, S. B., 1976:
Mechanism of action of the 12,13-epoxytrichothecene,
anguidine, an inhibitor of protein synthesis.
Biochim. biophys. A., 454, 273 - 284.
- LILLEHOJ, E. B., CIEGLER, A., 1967:
Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in *Flavo-*
bacterium aurantiacum by aflatoxin B₁.
J. Bact., 94, 787 - 788.

LILLEHOJ, E. B., CIEGLER, A., 1968:

Aflatoxin B₁ binding and toxic effects on *Bacillus megaterium*.

J. gen. Microbiol., 54, 185 - 194.

LILLEHOJ, E. B., CIEGLER, A., 1969:

Biological activity of aflatoxin B_{2a}.

Appl. Microbiol., 17, 516 - 519.

LILLEHOJ, E. B., CIEGLER, A., 1970a:

Aflatoxin B₁ effect on enzyme biosynthesis in *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*.

Can. J. Microb., 16, 1059 - 1065.

LILLEHOJ, E. B., CIEGLER, A., 1979 b:

Aflatoxin B₁ induction of lysogenic bacteria.

Appl. Microbiol., 20, 782 - 785.

LILLEHOJ, E. B., CIEGLER, A., HALL, H. H., 1967 a:

Aflatoxin B₁ uptake by *Flavobacterium aurantiacum* and resulting toxic effects.

J. Bact., 93, 464 - 471.

LILLEHOJ, E. B., CIEGLER, A., HALL, H. H., 1967 b:

Fungistatic action of aflatoxin B₁.

Exp., 23, 187 - 188.

LILLEHOJ, E. B., STUBBLEFIELD, R. D., SHANNON, G. M.,

SHOTWELL, O. L., 1971:

Aflatoxin M₁ removal from aqueous solutions by *Flavobacterium aurantiacum*.

Mycop., 45, 259 - 266.

MANN, R., 1975:

Abbau von Aflatoxin B₁ durch Mikroorganismen.
Diss. Universität Münster.

MANN, R., REHM, H. J., 1976:

Degradation products from aflatoxin B₁ by *Corynebacterium rubrum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* and *Mucor ambiguus*.
Eur. J. appl. Microbiol., 2, 297 - 306.

MANN, R., REHM, H. J., 1977:

Abbau von Aflatoxin B₁ durch verschiedene Mikroorganismen.
Z. Lebensmitt. Untersuch., 163, 39 - 43.

MAYER, V. W., LEGATOR, M. S., 1969:

Production of petite mutants of *Saccharomyces cerevisiae* by patulin.
J. Agr. Food Chem., 17, 454 - 456.

MEGALLA, S. E., MOHRAN, M. A., 1984:

Fate of aflatoxin B₁ in fermented dairy products.
Mycop., 88, 27 - 29.

MILLER, J. D., YOUNG, J. C., TRENHOLM, H. L., 1983:

Fusarium toxins in field corn. I. Time course of fungal growth and production of deoxynivalenol and other mycotoxins.
Can. J. Bot., 61, 3080 - 3087.

MIROCHA, C. J., 1979:

Trichothecene toxins produced by *Fusarium*.
In: SHIMODA, W., Conference on mycotoxins in animal feeds and grains related to animal health.
National technical information service,
Springfield, 288 - 373.

- MIROCHA, C. J., CHRISTENSEN, C. M., NELSON, G. H., 1971:
F-2 (zearalenone) estrogenic mycotoxin from *Fusarium*.
In: KADIS, S., CIEGLER, A., AJL, S. J., Microbial
toxins, Vol. 7,
Academic Press, New York, London, 107 - 138.
- MIROCHA, C. J., PATHRE, S. V., CHRISTENSEN, C. M., 1977:
Zearalenone.
In: RODRICKS, J. V. HESSELTINE, C. W., MEHLMAN, M. A.,
Mycotoxins in human and animal health.
Pathotox. Publishers, Inc., Gustav Fischer Verlag,
Stuttgart 345 - 364.
- NAUMANN, K., BASSLER, R., 1976:
Verband deutscher landw. Untersuchungs- und Forschungs-
anstalten. Methodenbuch Bd. III. Die chem. Untersuchung
von Futtermitteln.
Verlag J. Neumann-Neudamm, 18.1, 18.2
Melsungen, Berlin, Basel, Wien.
- OSSWALD, H., FRANK, H. K., KOMITOWSKI, D., WINTER, H., 1978:
Long-term testing of patulin administered orally to
sprague-dawley rats and swiss mice.
Food Cosm. Toxicol., 16, 243 - 247.
- PALYUSIK, M., HAGLER, W. M., HORVÁTH, L., MIROCHA, C. J., 1980:
Biotransformation of zearalenone to zearalenol by
Candida tropicalis.
Acta Vet. Hung., 28, 159 - 166.

- PATHRE, S. V., MIROCHA, C. J., CHRISTENSEN, C. M., BEHRENS, J., 1976:
Monoacetoxyscirpenol. A new mycotoxin produced by
Fusarium roseum 'Gibbosum'.
J. Agr. Food Chem., 24, 97 - 103.
- PATTERSON; D. S. P., ROBERTS, B. A., 1979:
Mycotoxins in animal feedstuffs: sensitive thin layer
chromatographic detection of aflatoxin, ochratoxin A,
sterigmatocystin, zearalenone and T-2 toxin.
J. Ass. Off. Ana. Chem., 62, 1265 - 1267.
- PAVANASASIVAN, G., JARVIS, B. B., 1983:
Microbial transformation of macrocyclic trichothecenes.
Appl. environ. Microbiol., 46, 480 - 483.
- PITOUT, M. J., 1969:
The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic
enzymes.
Biochem. Pharm., 18, 485 - 491.
- POHLAND, A. E., CUSHMAC, M. E., ANDRELLOS, P. J., 1968:
Aflatoxin B₁ hemiacetal.
J. Ass. Off. Anal. Chem., 51, 907 - 910.
- REISS, J., 1972:
Toxicity of rubratoxin B to fungi.
J. gen. Microbiol., 71, 167 - 172.

REISS, J., 1973:

Influence of the mycotoxins patulin and diacetoxyscirpenol on fungi.

J. gen. appl. Microbiol., 19, 415 - 420.

REISS, J., 1975 a:

Mycotoxin bioassay, using *Bacillus stearothermophilus*.

J. Ass. Off. Anal. Chem., 58, 624 - 625.

REISS, J. 1975 b:

Bacillus subtilis; a sensitive bioassay for patulin.

Bull. Envir. Contam. Tox., 13, 689 - 691.

RICHARDSON, K. E., WINSTON, M., HAGLER, J., HAMILTON, P. B., 1984:

Bioconversion of α -(¹⁴C) zearalenol and β -(¹⁴C) zearalenol into (¹⁴C) zearalenone by *Fusarium roseum* 'Gibbosum'.

Appl. environ. Microbiol., 47, 1206 - 1209.

ROBINSON. E. R., EMEH, C. O., 1976:

Degradation of rubratoxin B by washed mycelia of *Penicillium rubrum* P 2123.

Bull. Georg. Acad. Sci., 34, 67 (abstract).

RÜSCHENTHALER; R., CREPPY, E. E., DIRHEIMER, G., 1984:

Ochratoxin A: on the mode of action of a ubiquitous mycotoxin.

J. Toxicol.-Toxin Rev., 3, 53 - 86.

RÜSCHENTHALER, R., CREPPY, E. E., LORKOWSKI, G., DIRHEIMER, G., 1981:

Ochratoxin A - Die Wirkungsweise eines Mykotoxins.

For. Mikrobiol., 5, 262 - 270.

- ROMER, T. R., BOLING, T. M., McDONALD, J. L., 1978:
Gas-liquid chromatographic determination of T-2 toxin
and diacetoxyscirpenol in corn and mixed feeds.
J. Ass. Off. Anal. Chem., 61, 801 - 808.
- SCHAPPERT, K. T., KHACHATOURIANS, G. G., 1983:
Effects of fusariotoxin T-2 on *Saccharomyces cerevisiae*
and *Saccharomyces carlsbergensis*.
Appl. environ. Microbiol., 45, 862 - 867.
- SCHAPPERT, K. T., KHACHTOURIANS, G. G., 1984:
Influence of the membrane on T-2 toxin toxicity in
Saccharomyces spp..
Appl. environ. Microbiol., 47, 681 - 684.
- SCHINDLER, D., 1974:
Two classes of inhibitors of peptidyl transferase
activity in eukaryotes.
Nat., 249, 38 - 41.
- SCHINDLER, D., GRANT, P., DAVIES, J., 1974:
Trichodermin resistance-mutation affecting eukaryotic
ribosomes.
Nat., 248, 535 - 536.
- SHOTWELL, O. L., GOULDEN, M. L., BOTHAST, R. J., HESSELTINE, C. W.,
1975:
Mycotoxins in hot spots in grains: I. Aflatoxin and
zearalenone occurrence in stored corn.
Cer. Chem., 52, 687 - 697.

- SINGER, U., RÖSCHENTHALER, R., 1978:
Induction of autolysis in *Bacillus subtilis* by
ochratoxin A.
Can. J. Microb., 24, 563 - 568.
- SORENSEN, W. G., SNELLER, M. R., LARSH, H. W., 1975:
Qualitative and quantitative assay of trichothecin:
a mycotoxin produced by *Trichothecium roseum*.
Appl. Microbiol., 29, 653 - 657.
- STAFFORD, M. E., McLAUGHLIN, C. S., 1973:
Trichodermin, a possible inhibitor of the termination
process of protein synthesis.
J. Cell. Physiol., 82, 121 - 128.
- STEYN, P. S., 1971:
Ochratoxin and other dihydroisocoumarins.
In: CIEGLER, A., KADIS, S., AJL, S. J., Microbial
toxins, Vol VI: Fungal toxins.
Academic Press, New York, London, 179 - 207.
- STEYN, P. S., HOLZAPFEL, C. W., 1967:
The isolation of the methyl and ethyl esters of ochra-
toxin A and B, metabolites of *Aspergillus ochraceus* WILH.
J. S. Afr. Chem. Inst., 20, 186 - 189.
- STINSON, E. E., OSMAN, S. F., BILLS, D. D., 1979:
Water-soluble products from patulin during alcoholic
fermentation of apple juice.
J. Food Sci., 44, 788 - 789, 796.

- STINSON, E. E., OSMAN, S. F., HUHTANEN, C. N., BILLS, D. D., 1978:
Disappearance of patulin during alcoholic fermentation
of apple juice.
Appl. environ. Microbiol., 36, 620 - 622.
- STOTT, W. T., BULLERMANN, L. B., 1975:
Microbiological assay of patulin, using *Bacillus megaterium*.
J. Ass. Off. Anal. Chem., 58, 497 - 499.
- STUBBLEFIELD, R. D., SHOTWELL, O. L., SHANNON, G. M. WEISLEDER, D.,
ROHWEDER, W. K., 1970:
Parasiticol a new metabolite from *Aspergillus parasiticus*.
J. Agr. Food Chem., 18, 391 - 393.
- SUKROONGREUNG, S., SCHAPPERT, K. T., KHACHATOURIANS, G. G., 1984:
Survey of sensivity of twelve yeast genera toward
T-2 toxin.
Appl. environ. Microbiol., 48, 416 - 419.
- SUMBU, Z. L., THONART, P., BECHET, J., 1983:
Action of patulin on a yeast.
Appl. environ. Microbiol., 45, 110 - 115.
- TAMM, C., 1977:
Chemistry and biosynthesis of trichothecenes.
In: RODRICKS, J. V., HESSELTINE, C. W., MEHLMAN, M. A.,
Mycotoxins in human and animal health.
Pathotox Publishers, Inc., Gustav Fischer Verlag,
Stuttgart, 209 - 228.

EL-TAYEB, O., KNIGHT, S. G., SIH, C. J., 1964:

Steroid epoxide cleavage by *Cylindrocarpon radicicola*.
Biochim. biophys., 93, 402 - 410.

TAYLOR, A., 1971:

The toxicology of Sporidesmins and other epipoly-
thiadioxopiperazines.

In: KADIS, S., CIEGLER, A., AJL. S. J., Microbial toxins,
Vol, 7, Algal and fungal toxins.
Academic Press, New York, London, 337 - 376.

TEUNISSON, D. J., ROBERTSON, J. A., 1967:

Degradation of pure aflatoxins by *Tetrahymena pyriformis*.
Appl. Microbiol., 15, 1099 - 1103.

THONART, P., BECHET, J., SENE, S., SUMBU, Z. L., 1985:

Action of patulin on the glutathione pool in a yeast.
Book of abstracts, 6th JUPAC-symposium on mycotoxins
and phycotoxins, Pretoria, SA, 49.

TÖMÖRKÉNY, E., ALBRECHT, K., ILA, L., 1969:

Transformation of 4,5-epoxysteroids with *Mycobacterium*
phlei. Transformation under aerobic conditions.
Acta Microbiol. Hung., 16, 261 - 271.

TÖMÖRKÉNY, E., ALBRECHT, K., ILA, L., 1970:

Transformation of 4,5-epoxysteroids with *Mycobacterium*
phlei. Transformation under anaerobic conditions.
Acta Microbiol. Hung., 17, 199 - 204.

UENO, Y., 1977:

Mode of action of trichothecenes.

Ann. Nutr. Alim., 31, 885 - 900.

UENO, Y., 1980:

Trichothecene mycotoxins - mycology, chemistry and toxicology.

In: DRAPER, H. H., Advances in nutritional research, Vol. 3, Plenum Publishing Corporation, 301 - 353.

UENO, Y., 1983:

General Toxicology.

In: UENO, Y., Trichothecenes - chemical, biological and toxicological aspects.

Kodansha Ltd., Elsevier, Tokyo, Amsterdam, Oxford, New York.

UENO, Y., NAKAJIMA, M., SAKAI, K., ISHII, K., SATO, N., SHIMADA, N., 1973:

Comparative toxicology of trichothec mycotoxins: inhibition of protein synthesis in animal cells.

J. Biochem., 74, 285 - 296.

UENO, Y., NAKAYAMA, K., ISHII, K., TASHIRO, F., MINODA, Y., OMORI, T., KOMAGATA, K., 1983:

Metabolism of T-2 toxin in *Curtobacterium* sp. Strain 114-2. Appl. environ. Microbiol., 46, 120 - 127.

UENO, Y., UENO, I., IITOI, Y., TSUNODA, H., ENOMOTO, M., OHTSUBO, K., 1971:

Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria*.

III. Acute toxicity of fusarenon-X.

Jap. J. exp. Med., 41, 521 - 539.

UENO, Y., YAMAKAWA, H., 1970:

Antiprotozoal activity of scirpene mycotoxins of
Fusarium nivale Fn 2B.

Jap. J. exp. Med., 40, 385 - 390.

WAKSMANN, S. A., WOODRUFF, H. B., 1942:

Selective antibiotic action of various substances of
microbial origin.

J. Bact., 44, 373 - 384.

WALLEN, L. L., LYONS, A. J., PRIDHAM, T. G., 1980:

Antimicrobial activity of patulin derivatives: a
preliminary report.

J. Antibiot., 33, 767 - 769.

WEGNER, A., RÜSCHENTHALER, R., 1978:

Inhibition of *Bacillus subtilis* sporulation by
ochratoxin A.

FEMS Microbiol. Lett., 4, 147 - 150.

WEGST, W., LINGENS, F., 1983:

Bacterial degradation of ochratoxin A.

FEMS Microbiol. Lett., 17, 341 - 344.

WEI, C.-M., CAMPBELL, J. M., McLAUGHLIN, C. S., VAUGHAN, M. H.,
1974:

Binding of trichodermin to mammalian ribosomes and its
inhibition by other 12,13-epoxytrichothecenes.

Mol. cell. Biochem., 3, 215 - 219.

- WEI, R. D., SMALLEY, E. B., STRONG, F. M., 1972:
Improved skin test for detection of T-2 toxin.
Appl. Microbiol., 23, 1029 - 1030.
- WESTLAKE, K., DUTTON, M. F., MACKIE, R. I., 1985:
Trichothecene degradation by pure cultures of rumen
bacteria.
Book of abstracts, 6th JUPAC-symposium on mycotoxins and
phycotoxins, Pretoria, Sa, 53.
- WINKLE, S., 1979:
Mikrobiologische und serologische Diagnostik mit Be-
rücksichtigung der Pathogenese und der Epidemiologie.
3. Auflage, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York.
- YAMAZAKI, M., SUZUKI, S., SAKAKIBARA, Y., MIYAKI, K., 1971:
The toxicity of 5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3-
methyl-isocoumarin-7-carboxylic acid, a hydrolyzate
of ochratoxin A.
Jap. J. med. Sci. Biol., 24, 245 - 250.
- YOSHIZAWA, T., MOROOKA, N., 1975 a:
Biological modification of trichothecene mycotoins:
Acetylation and deacetylation of deoxynivalenol by
Fusarium spp..
Appl. Microbiol., 29, 54 - 58.

YOSHIKAWA, T., MOROOKA, N., 1975 b:

Comparative studies on microbial and chemical modifications of trichothecene mycotoxins.

Appl. Microbiol., 30, 38 - 43.

YOSHIKAWA, T., ONOMOTO, C., MOROOKA, N., 1980:

Microbial acetyl conjugation of T-2 toxin and its derivatives.

Appl. environ. Microbiol., 39, 962 - 966.

YOSHIKAWA, T., TAKEDA, H., OHI, T., 1983:

Structure of a novel metabolite from deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, in animals.

Agric. Biol. Chem., 47, 2133 - 2135.

Frau Prof. Dr. B. Gedek möchte ich für die Überlassung des Themas und ihre stets freundliche Unterstützung sehr herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr danke ich besonders für die mir gewährte Arbeitsmöglichkeit.

Herrn Dr. M. Gareis gilt mein besonderer Dank für seinen wertvollen Rat und die mir jederzeit gewährte, freundliche Aussprache.

Herrn Dr. J. Bauer danke ich herzlich für sein stetes Interesse und seine freundlichen Ratschläge.

Lebenslauf

Name: Ursula, Christine Zeilinger, geb. Hertfelder

Geburtstag: 10.07.1954

Geburtsort: Leutershausen, Mittelfranken

Eltern: Hannelore Hertfelder, geb. Schiffmacher
Dr. Kurt Hertfelder

Schul Ausbildung: 1960 - 1964 Volksschule Leutershausen
1964 - 1971 Theresiengymnasium Ansbach
1971 - 1973 Laurentiusgymnasium Neuendettelsau
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife,
8.06.1973

Berufsausbildung: 1973 - 1975 Ausbildung zur veterinär-
medizinisch-technischen Assistentin am
Landesuntersuchungsamt für Gesundheits-
wesen, Oberschleißheim

Berufsausübung: 1975 - 1977 Klinge Pharma München

Studium: 1977 - 1983 Studium der Tiermedizin an
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität München
Abschluß: Staatsexamen 20.05.1983

Approbation: 1.07.1983

Promotionsstudium: Ab Juni 1983 am Institut für Medizinische
Mikrobiologie, Infektions- und Seuchen-
medizin der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

